

**MIKROIONTOPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR KLÄRUNG DER TRANSMITTERFUNKTION
VON AMINO-DICARBONSÄUREN AN RUBRO-
SPINALEN ZELLEN DER KATZE**

Reinhard Steinberg

1974
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. K. Kramer, Prof. Dr. K. Thureau und

Prof. Dr. E. Gerlach

MIKROIONTOPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR KLÄRUNG DER
TRANSMITTERFUNKTION VON AMINO-DICARBONSÄUREN AN RUBRO-
SPINALEN ZELLEN DER KATZE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Reinhard Steinberg

aus

München

1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. ten Bruggencate
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Kramer
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	17.12.1974

I.	Einleitung	1
II.	Die Entwicklung der deutschen Literatur	2
1.	Die deutsche Literatur im Mittelalter	3
2.	Die deutsche Literatur in der Renaissance	4
3.	Die deutsche Literatur in der Barockzeit	5
4.	Die deutsche Literatur in der Aufklärung	6
5.	Die deutsche Literatur in der Romantik	7
6.	Die deutsche Literatur in der Biedermeierzeit	8
7.	Die deutsche Literatur in der Realistischen Epoche	9
8.	Die deutsche Literatur in der Moderne	10
9.	Die deutsche Literatur in der Gegenwart	11
III.	Die deutsche Literatur im Ausland	12
1.	Die deutsche Literatur in Frankreich	13
2.	Die deutsche Literatur in England	14
3.	Die deutsche Literatur in Italien	15
4.	Die deutsche Literatur in Spanien	16
5.	Die deutsche Literatur in Portugal	17
6.	Die deutsche Literatur in Griechenland	18
7.	Die deutsche Literatur in Russland	19
8.	Die deutsche Literatur in Amerika	20
9.	Die deutsche Literatur in Australien	21
10.	Die deutsche Literatur in Afrika	22
11.	Die deutsche Literatur in Asien	23
12.	Die deutsche Literatur in Ozeanien	24
13.	Die deutsche Literatur in der Sowjetunion	25
14.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik China	26
15.	Die deutsche Literatur in der Mongolei	27
16.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Korea	28
17.	Die deutsche Literatur in der Demokratischen Volksrepublik Vietnam	29
18.	Die deutsche Literatur in der Sozialistischen Republik Kuba	30
19.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Bolivien	31
20.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Peru	32
21.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Ecuador	33
22.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kolumbien	34
23.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Venezuela	35
24.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Argentinien	36
25.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Brasilien	37
26.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Chile	38
27.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Paraguay	39
28.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Uruguay	40
29.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Suriname	41
30.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Guyana	42
31.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Französisch-Guayana	43
32.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Martinique	44
33.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Guadeloupe	45
34.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Réunion	46
35.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Mayotte	47
36.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Saint-Pierre und Miquelon	48
37.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Französisch-Polynesien	49
38.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Neukaledonien	50
39.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Wallis und Futuna	51
40.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Französisch-Südafrika	52
41.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Namibia	53
42.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Botswana	54
43.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Lesotho	55
44.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Swasiland	56
45.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Mosambik	57
46.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Sambia	58
47.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Angola	59
48.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo	60
49.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Gabun	61
50.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Guinea	62
51.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Sierra Leone	63
52.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Liberia	64
53.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Elfenbeinküste	65
54.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Ghana	66
55.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Nigeria	67
56.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kamerun	68
57.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Togo	69
58.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Benin	70
59.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Mali	71
60.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Niger	72
61.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Chad	73
62.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Zentralafrikanische Republik	74
63.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	75
64.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	76
65.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	77
66.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	78
67.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	79
68.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	80
69.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	81
70.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	82
71.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	83
72.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	84
73.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	85
74.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	86
75.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	87
76.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	88
77.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	89
78.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	90
79.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	91
80.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	92
81.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	93
82.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	94
83.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	95
84.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	96
85.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	97
86.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	98
87.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	99
88.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	100
89.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	101
90.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	102
91.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	103
92.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	104
93.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	105
94.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	106
95.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	107
96.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	108
97.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	109
98.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Demokratische Republik Kongo	110
99.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Brazzaville	111
100.	Die deutsche Literatur in der Volksrepublik Kongo-Kinshasa	112

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Hinweise auf eine Funktion von Dicarboxyl-Aminosäuren als erregende Transmitter im ZNS von Säugetieren	2
1.2. Anatomie und Funktion des Nucleus ruber	7
1.3. Mögliche exzitatorische Transmitter im Nucleus ruber der Katze	8
2. <u>Methodik</u>	9
2.1. Narkose und Überwachung	9
2.2. Präparation	9
2.3. Reizung und Reizelektroden	11
2.4. Identifizierung des N. ruber	12
2.5. Mikroiontophorese	12
2.6. Iontophoreseelektroden	13
2.6.1. Konzentrische Elektroden	13
2.6.2. Seit-zu-Seit verklebte Elektroden	13
2.6.3. Herstellung der Iontophoreseelektroden	13
2.7. Substanzen und Freisetzung	16
2.8. Registrierung	16
3. <u>Ergebnisse</u>	18
3.1. Wirkung der Aminosäuren bei extrazellulärer Ableitung von Zellentladungen	18
3.2. Wirkung der Aminosäuren bei intrazellulärer Ableitung	22
3.2.1. Beeinflussung des Membranpotentials	22
3.2.2. Abhängigkeit der Wirkung von der Iontophoresestromstärke	27
3.2.3. Abhängigkeit der Wirkung vom Membranpotential	29
3.2.4. Beeinflussung der Membranleitfähigkeit	31
3.2.5. Beeinflussung synaptischer Potentiale	34
3.3. Wirkung der Substanzen HA-966 und GDEE	36

3.3.1.	Beeinflussung von extrazellulär gemessenen Entladungsraten	36
3.3.2.	Wirkung auf extrazelluläre Feldpotentiale	41
3.3.3.	Wirkung von GDEE bei intrazellulärer Ableitung	43
3.3.4.	Wirkung von HA-966 bei intrazellulärer Ableitung	45
4.	<u>Diskussion</u>	50
4.1.	Methodische Aspekte	50
4.2.	Wirkort der Aminosäuren	54
4.3.	Postsynaptische Wirkung der Aminosäuren	55
4.4.	Dosis-Wirkungsbeziehung	59
4.5.	Gleichgewichtspotential der Aminosäuren- Depolarisation	60
4.6.	Wirkstärkevergleich der Aminosäuren	62
4.7.	GDEE und HA-966	63
5.	<u>Zusammenfassung</u>	66
6.	<u>Literatur</u>	69

1. EINLEITUNG

Loewi entdeckte 1921 am Froschherzen das Prinzip neurochemischer Übertragung. 1926 identifizierte er zusammen mit Navratil den "Vagusstoff" als Acetylcholin. Bald darauf isolierten Cannon und Baq (1931) Noradrenalin als den vom Sympathicus am Herzen freigesetzten Überträgerstoff (Transmitter) und Acetylcholin wurde auch als Überträgerstoff im sympathischen Ganglion erkannt (Feldberg und Gaddum 1934). Dale und Mitarbeiter zeigten 1936, daß Acetylcholin an der motorischen Endplatte die Umsetzung von Nervenimpulsen in Muskelkontraktionen vermittelt. Dennoch erschien es bis zu den fünfziger Jahren den meisten Elektrophysiologen eher unwahrscheinlich, daß ein chemischer Prozeß die schnelle Übertragung von Signalen an zentralnervösen Synapsen bewirken könnte (Eccles 1949). Etwa zur selben Zeit, als mit dem Elektronenmikroskop die Strukturelemente der Synapse erkannt wurden, erbrachte die Entwicklung der Technik der intrazellulären Ableitung bei der Untersuchung synaptischer Übertragung am Muskel (Fatt und Katz 1951) und an zentralen Neuronen (Brock et al. 1952, Woodbury and Patton 1952) den Nachweis, daß auch im Zentralnervensystem (ZNS) chemische Überträgerstoffe eine bedeutende Rolle in der Signalübermittlung haben müssen. Seither konzentrieren sich zahlreiche neurobiologische Forschungen auf die Identifizierung der Stoffe, die nach Freisetzung aus präsynaptischen Terminalen zur Hemmung oder Erregung nachgeschalteter Nervenzellen führen.

Bei niederen Tieren wie bei Säugern scheinen nur wenige chemische Substanzen eine Funktion als synaptische Transmitter zu haben (Krnjević 1974). Neben den im peripheren Nervensystem wirksamen Stoffen (Catecholamine, Acetylcholin) werden hauptsächlich Dicarboxylaminosäuren und deren α -decarboxylierte Derivate, die neutralen ω -Aminosäuren, ferner Dopamin und Serotonin diskutiert. Wie Acetylcholin am Herzen hemmend, an der moto-

rischen Endplatte jedoch erregend wirkt, können auch an zentralnervösen Neuronen verschiedener Regionen gegensinnige Wirkungen einer Substanz gesehen werden (Krnjević 1974).

1.1. Hinweise auf eine Funktion von Dicarboxyl-Aminosäuren als erregende Transmitter im ZNS von Säugetieren

Seit Hayashi 1954 zum erstenmal die erregende Wirkung von Na^+ -Glutamat an corticalen Neuronen des Hundes beschrieb, sind zahlreiche biochemische und elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt worden, eine mögliche Funktion der Dicarboxyl-Aminosäuren Glutaminsäure (Glutamat = Glut) und Asparaginsäure (Aspartat = Asp) als physiologische erregende Überträgerstoffe nachzuweisen.

Bei wirbellosen Tieren konnte die Transmitterrolle von Glut bereits gesichert werden (Takeuchi und Takeuchi 1964, Gerschenfeld und Lasansky 1964, Kerkut et al. 1965, Otsuka et al. 1967). Die komplexere Struktur des Zentralnervensystems der Warmblüter verhinderte jedoch bisher eine exakte biochemische Bestimmung der Erregung und Hemmung vermittelnden Überträgerstoffe. In den letzten 20 Jahren wurden allerdings Ergebnisse gewonnen, die eine Transmitterfunktion der Aminosäuren Glut und Asp im ZNS von Säugetieren annehmen lassen.

Um eine Substanz als physiologischen Transmitter zu identifizieren, müssen verschiedene Kriterien erfüllt sein (McLennan 1963, Werman 1966, Phillis 1970), die sich in vier Punkten zusammenfassen lassen:

- a) Der Transmitter und seine auf- und abbauenden Enzymsysteme müssen in den Terminalen afferenter Bahnen nachzuweisen sein.

Unter den freien Aminosäuren erreicht Glut im Nervengewebe die höchste Konzentration, sie steigt vom Spinalganglion (Katze: $4,30 \pm 0,77 \mu\text{Mol/g}$ Gewebe) bis zur Großhirnrinde an (Gyrus Sylvii: $13,0 \pm 1,4 \mu\text{Mol/g}$, Johnson und Aprison 1970, 1971). Ungebundenes Asp ist gleichmäßiger verteilt, es ist

aber auch in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden als die meisten freien Aminosäuren und verwandten Substanzen (ventrales Rückenmark: $3,06 \pm 1,17 \mu\text{Mol/g}$, Graham et al. 1967). Ungebundenes Glut konnte in Nervenendigungen (Ryall 1964) in Verbindung mit synaptischen Vesikeln (Kuriyama et al. 1968) lokalisiert werden. Wofsey und Mitarbeiter (1971) isolierten aus Rattenhirngewebe eine einheitliche synaptosomale Fraktion, die spezifisch Glut und Asp anreichert. Beide Aminosäuren werden intrazellulär aufgenommen (Logan und Snyder 1972, Balcar und Johnston 1972 a,b), der Mechanismus ist für Glut und Asp wahrscheinlich identisch und kann pharmakologisch gehemmt werden (Steiner und Ruf 1966, Curtis et al. 1970).

Der Stoffwechsel von Glut ist komplex (van den Berg et al. 1973, Johnson 1972, Watkins 1972). Es werden wenigstens zwei verschiedene Synthese- und Abbauwege angenommen, einer, der exogenes Glut in Glutamin umwandelt, und ein zweiter, in dem endogenes Glut aus Glukose synthetisiert wird. Letzterer könnte neben der Bereitstellung von Stoffwechselenergie der Synthese von Glut-Transmitter dienen, während der erste die Inaktivierung von synaptisch freigesetztem Glut bewirken könnte (Curtis und Johnston 1974, Krnjevic 1974). Der Metabolismus von Asp scheint dem von Glut eng verbunden zu sein, ungebundenes Asp kann als Vorläufer der Glut-Synthese dienen (Johnston 1973), es wird wie freies Glut in Glutamin umgewandelt (Curtis und Johnston 1974).

- b) Bei Reizung muß der Überträgerstoff freigesetzt werden und in der synaptischen Region gesammelt werden können

Reizung der Formatio reticularis erhöht am cerebralen Cortex die Freisetzung von Glut auf das drei- bis siebenfache (Jasper und Koyama 1969); das Anwachsen der Asp-Konzentration ist weniger ausgeprägt. Reizung von Hinterstrangfasern führt zu deutlich vermehrter Freisetzung von markiertem Glut aus den N. gracilis und N. cuneatus der Ratte, was die vermutete Transmitterfunktion dieser Aminosäure in den Terminalen der primären afferenten Bahnen unterstützt (Roberts 1974). In

vitro-Untersuchungen zeigten, daß aus Synaptosomen von Ratten Glut und Asp durch Stimulierung mit elektrischen Feldern freigesetzt wird (Bradford 1970).

- c) Applikation des mutmaßlichen Überträgerstoffes an der postsynaptischen Membran muß Effekte ausüben, die der physiologisch-synaptischen Wirkung vergleichbar sind.

Die Einführung der Technik der Mikroiontophorese (Nastuk 1953, Curtis et al. 1964, s. 2.5.) brachte eine wesentliche Erweiterung der Möglichkeiten, zentral wirksame Substanzen und deren Wirkungsmechanismen an der Zellmembran untersuchen zu können. Gegenüber systemischer oder topischer Gabe einer Substanz hat die iontophoretische Applikationsweise deutliche Vorteile: Unter Umgehung der Blut-Hirnschranke kann die Substanz direkt in der Nähe der zu untersuchenden Neurone freigesetzt werden. Enzymatischer Abbau oder Umwandlung auf dem Weg ins ZNS (z.B. durch die Leber, den Verdauungstrakt) ist ausgeschlossen, ebenso eine Wirkung an weiter entfernt liegenden Nervensystemen, die den Effekt an den untersuchten Neuronen maskieren könnte. Außerdem kann mit Konzentrationen gearbeitet werden, die der Konzentration der Transmitter in der Synapse nahe kommen (Curtis und Johnston 1974), die aber bei systemischer Gabe an einigen Organen bereits toxisch wären (Olney et al. 1971).

Der Mechanismus der Erregung zentraler Neurone von Säugetieren durch Glut und Asp konnte mit Hilfe iontophoretischer Applikationsweise zum Teil aufgedeckt werden. Beide Aminosäuren depolarisieren reversibel corticale und spinale Motoneurone, bei Überschreiten der Entladungsschwelle werden Aktionspotentiale ausgelöst. Die Potentialänderung ist von einer Leitfähigkeitszunahme der Membran begleitet (Curtis et al. 1960, Krnjević und Schwartz 1967, Ziegelgänsberger und Puil 1973a) Intrazelluläre Injektionen von K^+ - oder Cl^- -Ionen, die die hyperpolarisierende Wirkung von Glycin an spinalen Motoneuronen der Katze in eine Depolarisation umkehrten, beeinflussten die Depolarisationen durch Glut oder durch synap-

tische Erregung nicht (Curtis et al. 1972). Ein Vergleich der Umkehrpotentiale der Aminosäurendepolarisationen und der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP) (Curtis 1965, Ziegelgänsberger und Puil 1973a) läßt die Annahme zu, daß beiden Depolarisationen ein gleichartiger Ionenmechanismus zu Grunde liegt, nämlich eine spezifische Leitfähigkeitszunahme der Membran für Na^+ - und K^+ -Ionen (Coombs et al. 1955, Eccles 1964). Dafür spricht auch, daß Glut bei in-vitro-Untersuchungen an Hirngewebe eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration bewirkt (Balcar und Johnston 1972 a). Die erregende Wirkung beider Aminosäuren ist quantitativ in zahlreichen Hirnregionen etwa gleich stark ausgeprägt, im Rückenmark der Katze hat Glut allerdings eine stärkere Wirkung im Hinterhorn, während Asp Interneurone des Vorderhorns relativ stärker erregt. Eine Transmitterfunktion von Asp an Renshaw-Zellen wird diskutiert (Davidoff et al. 1967, Duggan 1973).

d) Der physiologische Transmitter und der mutmaßliche Überträgerstoff müssen pharmakologisch gleichartig beeinflussbar sein.

Wie an der motorischen Endplatte zum Beispiel sowohl die Acetylcholinwirkung wie das Endplattenpotential kompetitiv durch Curare gehemmt werden, sollte auch an zentralen Neuronen das EPSP wie die Aminosäurendepolarisationen pharmakologisch gleichförmig beeinflusst werden können. Zahlreiche Pharmaka wurden auf ihre Verwendbarkeit als spezifischer Blocker physiologischer und durch Glut und Asp hervorgerufener Exzitation untersucht. Die meisten zeigten jedoch eine hemmende Eigenwirkung an der Nervenmembran, die eine alleinige Interaktion mit dem Rezeptor des natürlichen Transmitters und dem möglicherweise identischen Aminosäuren-Rezeptor ausschließen (Curtis und Johnston 1974, Krnjević 1974).

Zwei Substanzen wurden in letzter Zeit als spezifische Hemmer des EPSP's und der erregenden Wirkung der Aminosäuren genannt: 1-Hydroxy-3-amino-pyrrolidone-2 (HA-966) wurde 1971 von Bonta

und Mitarbeitern untersucht. Bei systemischer Gabe dieser Droge, die in Struktur und Ladungsverteilung der zyklischen Form der hemmenden Aminosäure GABA (γ -amino-Buttersäure) gleicht, konnten die Autoren bei verschiedenen Säugetieren eine Hemmung zentralnervöser Strukturen feststellen. Davies und Watkins (1972, 1973) gaben HA-966 als spezifischen Blocker der Glut und Asp-Exzitation an, auch die synaptische Erregung wurde hemmend beeinflusst. Ihren Untersuchungen lagen extrazelluläre Messungen der Entladungsraten von Neuronen aus dem Cortex und dem N. cuneatus der Katze zu Grunde, die mit mikroiontophoretisch applizierten Aminosäuren oder synaptisch erregt wurden.

Bei psycho-physiologischen Untersuchungen an verschiedenen Versuchstieren (Desi et al. 1967) ergab sich eine antagonistische Wirkung von Glutamat-Diäthyl-Ester (GDEE) gegenüber Glutaminsäure. Haldeman und Mitarbeiter (1972 a,b, 1973) sahen bei extrazellulärer Ableitung der Aktionspotentiale von Neuronen aus dem Rückenmark, dem Thalamus und dem N. cuneatus der Katze eine spezifische Blockierung Glut- und Asp-induzierter und synaptischer Erregung. DL-Homocysteat (DL-H), eine im ZNS nicht vorkommende sulfonyl-substituierte Aminosäure (Curtis 1965), die zentrale Neurone stärker erregt als Glut (Curtis und Watkins 1963), wurde durch GDEE nicht gehemmt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde versucht, die Mechanismen der erregenden Wirkung der Aminosäuren Glut, Asp und DL-H an rubrospinalen Neuronen mit Hilfe der Technik der Mikroiontophorese bei intrazellulärer Ableitung aufzudecken. Um eine mögliche pharmakologische Identität der Aminosäuren Glut oder Asp mit dem physiologischen erregenden Transmitter nachweisen zu können, wurden die Substanzen GDEE und Ha-966 als möglicherweise spezifische Blocker dieser Aminosäuren angewendet.

1.2. Anatomie und Funktion des Nucleus ruber

Der N. ruber der Katze ist ein motorischer Kern des Mittelhirns, der als Schaltstelle corticaler und cerebellärer Afferenzen eine wichtige Funktion im extrapyramidalmotorischen System hat. Seine im Tractus rubrospinalis descendierenden Efferenzen fördern den Tonus kontralateraler Flexormuskeln, die Extensormuskeln werden gegensinnig beeinflusst (Massion 1967).

Histologisch können drei Neuronengruppen unterschieden werden: Große Zellen mit einem Durchmesser bis zu 90 μm , mittlere (50 μm) und kleine Zellen (20 μm). Die beiden letzten Zellarten sind im gesamten Kerngebiet vorhanden, die großen Neurone werden hauptsächlich in caudaleren Teilen des N. ruber gefunden. An Soma und Dendriten der rubrospinalen Neurone finden sich zahlreiche Synapsen von Kleinhirn- und Großhirnbahnen, das Soma der kleinen Neurone zeigt keine synaptischen Strukturen (Tredici et al. 1973). Die Neuroglia ist stark ausgebildet, lamelläre Fortsätze umgeben Gruppen von Synapsen und trennen dadurch möglicherweise unterschiedliche funktionelle Felder voneinander (Tredici et al. 1973).

Vom ipsilateralen sensomotorischen Cortex ziehen exzitatorische Bahnen zum N. ruber, die an Dendriten der Neurone monosynaptisch endigen (Tsukahara und Kosaka 1968). Der kontralaterale N. interpositus des Kleinhirns hat einen tonischen erregenden Einfluß auf die mittleren und großen Zellen, seine Bahnen ziehen durch das brachium conjunctivum und enden ohne Umschaltung an Zellsoma und proximalen Dendriten (Tsukahara et al. 1967). Kollateralen der Pyramidenbahn erregen über langsam leitende Fasern monosynaptisch, schnelle Fasern hemmen disynaptisch (Tsukahara et al. 1968, Tsukahara und Fuller 1969) rubrospinale Zellen. Als hemmende Interneurone kommen möglicherweise die kleinen rubralen Zellen in Frage (King et al. 1974).

1.3. Mögliche exzitatorische Transmitter im Nucleus ruber der Katze

Davis und Vaughan (1969) konnten bei extrazellulärer Ableitung der Entladungsfrequenz von rubrospinalen Neuronen der Katze eine stark erregende Wirkung von iontophoretisch freigesetztem Glut registrieren. DL-H hatte an diesen Zellen einen etwa zweimal stärkeren Effekt. Acetylcholin, Serotonin, Catecholamine, Dopamin und chemische Verwandte dieser Substanzen verminderten die Spontanaktivität oder die durch die Aminosäuren hervorgerufene Erregung. γ -amino-Buttersäure (GABA), das Decarboxylierungsprodukt von Glut, erfüllt weitgehend die Kriterien eines inhibitorischen Transmitters an rubrospinalen Zellen (Altmann et al. 1973), Glycin, ein möglicher hemmender Transmitter im Rückenmark der Katze, war weniger wirksam.

Im menschlichen N. ruber liegt freies Glut in einer Konzentration vor ($4,95 \pm 0,47 \mu\text{Mol/g}$), die etwa der Hälfte der maximalen Konzentration entspricht (temporaler Cortex: $10,78 \pm 0,63 \mu\text{Mol/g}$). Die Verteilung von freiem Asp entspricht sich in beiden Regionen (N. ruber: $1,96 \pm 0,33 \mu\text{Mol/g}$; temp. Cortex: $1,89 \pm 0,44 \mu\text{Mol/g}$; Perry et al. 1971). Vom N. ruber der Katze sind keine vergleichbaren biochemischen Daten vorhanden; im colliculus superior beträgt die Konzentration von Glut $7,95 \pm 1,5 \mu\text{Mol/g}$ (Johnson und Aprison 1971).

2. METHODIK

2.1. Narkose und Überwachung

Die Versuche wurden an 27 Katzen beiderlei Geschlechts (2,0 - 3,6 kg) durchgeführt. Die Narkose wurde mit Halothan^R eingeleitet und nach Tracheotomie für die Dauer der Präparation mit einem Äther-Luftgemisch aufrechterhalten. Vor Beginn der elektrophysiologischen Untersuchungen wurde die Narkose auf Chloralose (40-50 mg/kg) oder Nembutal^R (30-40 mg/kg) umgestellt, die Tiere mit Pancuronium^R relaxiert und künstlich beatmet. Ein Ultrarot-Absorptionsschreiber diente zur Registrierung der endexpiratorischen CO₂-Konzentration der Atemluft, die möglichst auf 4 % konstant gehalten wurde. Arteria und Vena femoralis wurden katheterisiert. Über die A. femoralis konnte mit einem Druckaufnehmer (Statham) der Blutdruck kontinuierlich registriert werden (Verstärker: Hellige), ein Absinken des Mitteldrucks unter 80 mmHg wurde durch intravenöse Infusion geringer Mengen Arterenols^R verhindert. Wärmezufuhr aus einem Infrarotstrahler hielt die rektal gemessene Körpertemperatur der Versuchstiere auf 37-38° C. Im Großteil der Experimente wurde zur Verringerung von atemsynchronen Bewegungen des Hirnstamms bilateral ein Pneumothorax angelegt.

2.2. Präparation

In 10 Experimenten wurde der Zugang zum N. ruber von dorsal gewählt. Der Kopf des Tieres wurde in einem stereotaktischen Kopfhalter fixiert, der eine Orientierung in allen Raumebenen gestattete. Nach Abtragen des hinteren Teiles der Schädelkalotte wurden der Occipitalpol und der Hippocampus beider Hemisphären bis zur Vierhügelplatte abgesaugt, der rote Kern dann mit Elektroden durch die oberen Vierhügel aufgesucht (s. Abb. 1). Da durch diese Operation gelegentlich schwer stillbare Blutungen mit nachfolgendem Hirnödem entstanden, wurde in 17 weiteren Experimenten der N. ruber von ventral angegangen. Nachdem

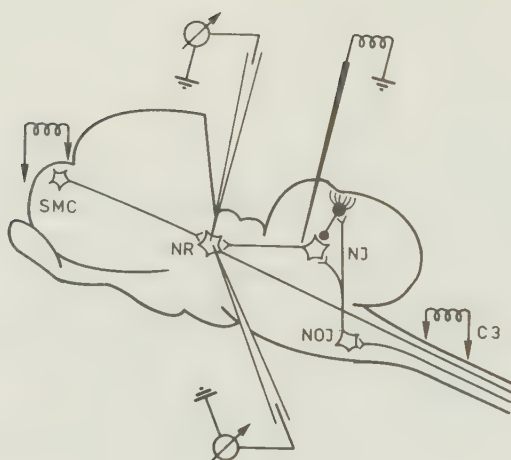


Abb. 1.: Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens

Der N. ruber (NR) wurde mit den Ableitelektroden entweder von dorsal nach Entfernung des Occipitallappens durch die oberen Vierhügel angegangen, oder von ventral durch die Pons. Der N. interpositus (NI) des Kleinhirns wurde mit Wolframelektroden stereotaktisch aufgesucht, die Reizung erfolgte monopolar gegen eine indifferente Elektrode im Körper des Tieres. Der sensomotorische Cortex (SMC) und das Cervicalmark (C₃) wurden bipolar mit aufgelegten Silberballelektroden gereizt. Die Verschaltung dieser Hirnregionen und des bei Rückenmarksreizung aktivierten N. olivaris inferior (NOI) sind schematisch wiedergegeben.

Trachea und Ösophagus über der Schädelbasis und den ersten beiden Cervicalsegmenten der Wirbelsäule entfernt waren, wurde die Schädelbasis zwischen den Bullae tympanicae eröffnet. Der Vortrieb der Elektroden zum Kerngebiet erfolgte durch die Pons (s. Abb. 1).

Um die mit dem N. ruber verschalteten Hirnareale elektrisch reizen zu können, wurde außerdem die Schädelkalotte über dem sensomotorischen Cortex (SMC) und dem Kleinhirn trepaniert, das Cervicalmark bei C₂/C₃ freigelegt. Um diese Hirnteile vor Austrocknung zu schützen, wurden sie mit körperwarmem Paraffin bedeckt bzw. nach Fixierung der Reizelektroden mit Dentalzement verklebt (Übersicht in Abb. 1).

2.3. Reizung und Reizelektroden

Zur bipolaren Reizung des sensomotorischen Cortex wurden Silberball- oder Silberplättchenelektroden nach Entfernung der Dura mater auf die Gyri prä- und postcentrales aufgelegt und unter Schonung des Hirngewebes am Knochen fixiert. Das Cervicalmark wurde mit beidseitig dorsolateral angelegten Plättchenelektroden bipolar gereizt, der kontralaterale N. interpositus mit glasisolierten Wolframelektroden von dorsal stereotaktisch aufgesucht und monopolar gereizt.

Die Wolframelektroden wurden folgendermaßen hergestellt: Wolframdraht von 5 mm Ø wird auf einer Länge von 2 cm elektrolytisch angespitzt (Spitzendurchmesser um 1 µm bei einer Schaftdicke zwischen 20 und 50 µm). Über dem angespitzten Teil wird mit einem herkömmlichen Elektrodenziehgerät eine Glaskapillare (Ø außen: 1,5 mm; Ø innen: 0,9 mm) fein ausgezogen, die Glasschicht legt sich mit einer Dicke von 2-10 µm dem Metall fest an. Die Spitze wird auf einer Länge von ca. 500 µm von Glas befreit und das Wolframende unter mikroskopischer Sicht elektrolytisch nachgespitzt. Zur Reizung wurden Elektroden verwendet, die bei 200-300 µm freier Wolframspitze Widerstände zwischen 20 und 50 kΩ hatten. Die gute Rohrelastizität der Glasisolierung gestattet die Verwendung dieser schlanken Elektroden aus dem relativ weichen Metall Wolfram.

Das Rückenmark wurde mit Spannungspulsen von 0,1 ms Dauer gereizt, die Schwellenreizstärke variierte je nach Lage der Elektroden zwischen 10 mV und 0,5 V. Der sensomotorische Cortex und der N. interpositus wurden mit stromkonstanten Pulsen (Dauer 0,1 ms) stimuliert, die Schwelle der Kleinhirnneurone war zwischen 20 μ A und 100 μ A, die Reizschwelle corticaler Neurone lag meist höher.

2.4. Identifizierung des N. ruber

Bei Reizung des rubrospinalen Traktes (bei C_2/C_3) entsteht durch die synchrone antidrome Invasion der rubrospinalen Zellen ein extrazellulär registrierbares negatives fokales Potential mit kurzer Latenzzeit (s. Abb. 13), das nur im Kerngebiet ableitbar ist und daher zur Identifizierung und Abgrenzung des Kerns verwendet werden kann (Tsukahara et al. 1968). Bei intrazellulärer Ableitung aus rubrospinalen Zellen kann das antidrom ausgelöste Aktionspotential gesehen werden. In einigen Experimenten wurde die Ableitelektrode im Kern belassen, das Gehirn in 4%-iger Formalinlösung fixiert, und anhand des Stichkanals die histologische Kontrolle des elektrophysiologischen Vorgehens erbracht.

2.5 Mikroiontophorese

Die Methodik der Mikroiontophorese (Nastukl 1953, Curtis et al. 1964) ist im Prinzip bei allen Elektrodentypen gleich: Eine Ableitelektrode wird von mehreren Mikrokapillaren dicht umgeben, welche die zu untersuchenden Substanzen in ionisierter Form enthalten. Durch Anlegen einer Gleichspannung zwischen Kapillare und Gewebe werden die wässrig gelösten Moleküle aus der Elektroden spitze freigesetzt. Die Polarität des Phoresestromes richtet sich nach der Ladung der freizusetzenden Substanz. Da mit ansteigender Stromstärke die freigesetzte Molekülmenge zunimmt (s. 4.1.), ist es üblich, die Stärke des Iontophoresestromes als indirektes, relatives Maß der erreichten Wirkstoffkonzentration heranzuziehen. In dieser Arbeit beziehen sich daher alle Vergleiche der Wirkungsstärke zweier Substanzen auf die Größe der Iontophoreseströme.

2.6. Iontophoreseelektroden

Intrazelluläre Ableitungen aus rubrospinalen Zellen erforderten den Bau feiner Elektroden mit langem, schlankem Schaft, um bei einem Elektrodenweg von 8-10 mm von der Oberfläche zum N. ruber Durckeinwirkungen auf das umliegende Nervengewebe möglichst gering zu halten. Häufiges Abbrechen der feinen Kapillaren an Blutgefäßen (Pons und N. ruber sind gut durchblutet, Tredici et al. 1973) mußte in Kauf genommen werden.

Es wurden zwei Elektrodentypen verwendet.

2.6.1. Konzentrische Elektroden (Sonnhof 1973)

Ein Kranz von 5 miteinander verschmolzenen Mikrokapillaren umgibt die innere Ableitelektrode, deren Spitze die der Kapillaren um 50-80 μm überragt. Der Durchmesser der beiden Spitzen war 0,8-1,6 μm , bzw. 4-6 μm (Abb. 2 A,B,D). Der Widerstand der Ableitelektroden betrug 5-50 $\text{M}\Omega$, sie wurden mit 2 M Kaliumcitratlösung gefüllt, der 10 % einer 2 M KCl Lösung beigemischt waren. Die Iontophoresekapillaren waren mit den zu untersuchenden Substanzen gefüllt. Der Widerstand dieser Lösungen betrug je nach Durchmesser der einzelnen Öffnungen (0,5-2 μm) zwischen 10 und 150 $\text{M}\Omega$.

2.6.2. Seit- zu Seit verklebte Elektroden

Bei diesen Elektroden ist die Ableitelektrode nicht durch die Mitte der Iontophoresekapillaren geführt, sondern seitlich achsenparallel verklebt (Abb. 2 C). Durchmesser der Spitzen und Widerstände entsprechen denen des konzentrischen Typs.

2.6.3. Herstellung der Iontophoreseelektroden

Zur Anfertigung der Mehrfachelektroden wurden für beide Elektrodentypen 4 oder 5 Pyrexglasrohre (Länge: 5 cm; $\emptyset$ außen: 8 mm; $\emptyset$ innen: 6 mm) in einer Gas-Pressluftflamme unter Beimischung von Sauerstoff längsseits zu einem Zylinder verschmolzen. Die Mitte wurde stark erhitzt und mit der Hand auf einen

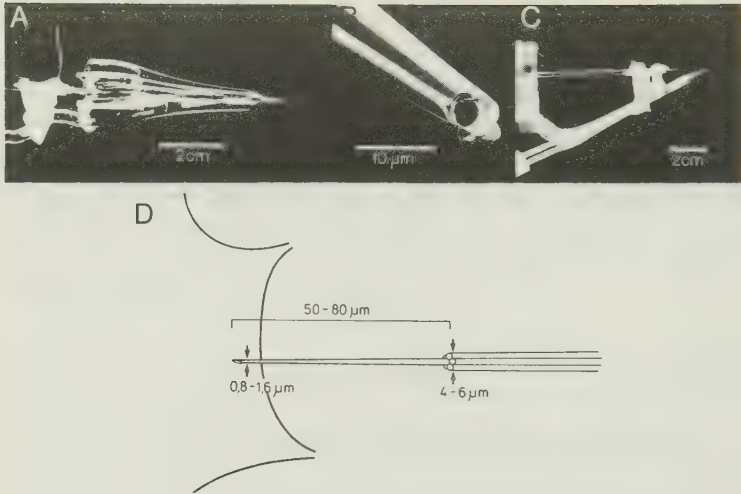


Abb. 2: Iontophoreseelektroden

- A: Iontophoreseelektrode vom konzentrischen Typ: Achsenparallel zu der fein ausgezogenen Spitze der Mehrfachelektrode (rechts) wurde die Ableitelektrode durch die Mitte der Phoresekapillaren hindurchgeschoben (s. a. Schema in D). Beide Elektroden sind durch einen Schnellklebstoff miteinander verbunden (links).
- B: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Spitze einer auf 6 μm abgebrochenen Mehrfachelektrode (Sonnhof 1973). Die Iontophoresekapillaren sind offen, sie lassen in der Mitte einen Kanal frei, durch den die Ableitelektrode hindurchgeschoben werden kann.
- C: Seit-zu-Seit verklebte Iontophoreseelektrode. Die fein ausgezogene Spitze der Mehrfachelektrode ist angewinkelt, die Ableitelektrode achsenparallel verbunden. Neben der Fixierung durch einen Klebstoff ist ein Teil der Halterung der Mikromanipulatoren abgebildet (Sonnhof 1973).
- D: Schematische Darstellung einer konzentrischen Elektrode bei intrazellulärer Ableitung. Die Durchmesser und die Abstände der Spitzen von Ableit- und Mehrfachelektroden sind angegeben. Sie entsprechen denen des Seit-zu-Seit verklebten Elektrodentyps.

Durchmesser von ca. 6 mm ausgezogen. Dieser Rohling wurde in ein gebräuchliches Vertikal-Elektrodenziehgerät eingespannt, mit einer Heizschlinge erhitzt und unter magnetischem Zug etwa 30 mm lang fein ausgezogen. Unter mikroskopischer Sicht konnte dann die Spitze auf 4-6 μm abgebrochen werden (Abb. 2 B).

Die Ableitelektroden wurden aus Pyrexglaskapillaren ($\emptyset$ außen: 1,5 mm; $\emptyset$ innen: 0,9 mm) gezogen. Es wurden Elektroden mit Spitzendurchmesser unter 1 μm verwendet, die Widerstände lagen in der Größenordnung von 10-30 $\text{M}\Omega$. In einem Teil der Experimente wurden die Spitzen unter dem Mikroskop auf 1,6 μm abgebrochen, um bei Widerständen unter 10 $\text{M}\Omega$ Stromgabe durch die Ableitelektrode zu erleichtern.

Zur Herstellung der konzentrischen Iontophoreseelektroden wurde die Mehrfachelektrode in einen Mikromanipulator (Leitz) eingespannt, mit einem anderen (Narishige) die Ableitelektrode von hinten durch den Kranz der Mikrokapillaren soweit durchgeschoben, daß ihre Spitze die der Mikrokapillaren um 50-80 μm überragte (Abb. 2A und B). Dieser Arbeitsgang wurde mit mikroskopischer Kontrolle in 2 Ebenen durchgeführt. Nach Justierung konnten beide Elektroden am Schaft mit einem Schnellklebstoff (X-60, Hottinger Baldwin Meßtechnik) aneinander fixiert werden.

Bei den Seit-zu-Seit verklebten Elektroden wurde vor dem Justieren der schlanke Schaft der Mehrfachkanäle mit einer Heizschlinge leicht angewinkelt, die beiden Elektroden mit den selben Manipulatoren wie oben parallel aneinandergelegt, so daß mit einem flüssigen Klebstoff (Polystyrene Q-Dope, Walsco) die Spitzen auf eine Länge von 2-5 mm miteinander verbunden werden konnten. Zur endgültigen Fixierung der Elektrodenschäfte diente der Klebstoff X-60.

2.7. Substanzen und Freisetzung

Die Iontophoresekapillaren waren gefüllt mit 0,5 bis 1 M Lösungen von Na-L-Glutaminat (pH 8,5), L-Asparaginsäure-Mononatriumsalz (pH 8), DL-Homocysteinsäure (pH 8), und Glutamat-diäthylester (pH 3,5). 1-Hydroxy-3-amino-pyrrolidone-2 (HA-966) war 0,2 molar gelöst, das pH wurde auf 5,5 oder 8,3 eingestellt. Um Effekte ermessen zu können, die nur auf der Passage elektrischer Ladungen beruhen, wurde ein Kanal jeder Iontophoreseelektrode mit einer 165 mM NaCl-Lösung gefüllt. Der pH-Wert der Substanzlösungen wurde mit 1 n HCl oder 2 n NaOH eingestellt, bei den angegebenen pH Werten liegt ein Großteil der Aminosäuren-Moleküle in negativ geladener Form vor und kann als Anionenstrom freigesetzt werden. HA-966 konnte entweder mit anionischem (bei pH 8,3) oder wie GDEE mit kationischem Stromfluß (bei pH 5,5) appliziert werden.

Zur Freisetzung der Substanzen stand ein Iontophoresegerät zur Verfügung, das vier voneinander unabhängige Kanäle besaß. In 26 Stufen konnte der Stromfluß von 5-520 nA abgegriffen werden. Der vorwählbare Stromwert war von den unterschiedlichen Widerständen der Kapillaren unabhängig. Über einen Regelkreis wurde mit einer Kompensationsspannung von 50 V der Sollwert des Phoresestromes konstant gehalten. Zur Kontrolle diente ein in jedem Kanal in Serie geschaltetes Amperemeter. Um Diffusion der gegenüber dem Gewebe hochmolekularen Substanzen aus den Kapillaren zu verhindern, konnte ein Rückhaltestrom bis zu 30 nA angelegt werden. Bei starker Erhöhung der Elektrodenwiderstände wurde durch Einschalten einer Spannung von 50 V versucht, die Elektrode wieder stromdurchgängig zu machen.

2.8. Registrierung

Die mit der Ableitelektrode registrierten Signale wurden über eine Silber-Silberchloridbrücke einem Kathodenfolger zugeführt (Eide 1968). Die obere Frequenzbreite des Verstärkers betrug 1 MHz. Eine Kapazitätsrückkopplung gestattete die Kompensation

an der Elektrode auftretender Kapazitäten bis ca. 10 pF. Gleichspannungspotentiale an Elektrodenspitze oder Schaft konnten mit einer Gegenspannung bis zu ± 1 V abgeglichen werden.

Zwei voneinander unabhängige Generatoren ermöglichten es, konstante Ströme als Gleichstrom oder pulsierenden Gleichstrom über die Ableitelektrode fließen zu lassen. Mit Gleichstrom konnte das Membranpotential verändert werden, um die Abhängigkeit der Aminosäurenwirkung vom Membranpotential untersuchen zu können (s. 3.2.3.). Mit stromkonstanten Rechteckimpulsen war es möglich, den Membranwiderstand zu bestimmen. Da bei intrazellulärer Ableitung Elektroden- und Membranwiderstand sich addieren, wurde vor Penetration der Zellmembran der Elektrodenwiderstand über eine Wheatstone'sche Brückenschaltung abgeglichen. Bei intrazellulärer Ableitung entspricht dann der Spannungsabfall des stromkonstanten Pulses, der auf dem Oscilloscop ablesbar ist, dem Spannungsabfall über dem Membranwiderstand (s. 3.2.4.).

Die Ausgangsspannung des Kathodenfolgers brachte bereits eine zehnfache Signalverstärkung. Sie wurde zur Registrierung schneller Potentialänderungen zwei Oscilloscopen (Tektronix 5030) zugeführt, zur Registrierung des Membranpotentials bei intracellulärer Ableitung wurde sie einem Papierschreiber (Minograph 800, Siemens, oder Multicorder, Watanabe) eingespeist. Mit einer Kamera (Grass C-4) wurden die Signale von den Oscilloscopen fotografiert.

Messungen der extrazellulären Feldpotentiale (s.3.3.2.) wurden über einen Computer (Didac C 800, Intertechnique) ausgeführt; um statistische Schwankungen der Amplituden der fokalen Potentiale zu eliminieren, wurden 20-30 Oscilloscoppdurchläufe gemittelt. Die gespeicherten Messungen wurden auf ein Oscilloscop übertragen und fotografiert.

Extrazellulär registrierte Zellentladungen wurden vom Oscilloscopausgang auf einen Zähler (Universal Counter 5325 B, Hewlett-Packard) gegeben und von diesem einem Papierschreiber eingespeist (Digital-Analog Converter 581 A, Hewlett-Packard). Die Analysezeit betrug 1 Sekunde, der Frequenzgang der Geräte betrug 0-20 MHz.

3. ERGEBNISSE

3.1. Wirkung der Aminosäuren bei extrazellulärer Ableitung von Zellentladungen

An 23 rubrospinalen Neuronen wurde bei extrazellulärer Ableitung der Aktionspotentiale die Wirkung der Aminosäuren Glut, Asp und DL-H auf die Entladungsfrequenz untersucht. Bei allen Zellen kam es unter Einwirkung dieser Aminosäuren zu einer Zunahme der Frequenz der spontanen Entladungen. Neurone ohne Spontanaktivität wurden zur Entladung von Aktionspotentialen angeregt.

Die exzitatorische Wirkung der Aminosäuren war abhängig von der freisetzensenden Iontophoresestromstärke und damit vermutlich von der in der Umgebung der Zelle erreichten Konzentration der Aminosäuren. In Abb. 3 sind die Aktionspotentiale eines Neurons vom Oscilloscop einem Frequenzzähler eingegeben, und die Entladungsfrequenz mit einem Schreiber analog über die Zeit (Imp/s) aufgezeichnet.

In A ist die erregende Wirkung von Glut, mit drei verschiedenen Phoressestromstärken freigesetzt, dargestellt. Die Latenz des Wirkungseintritts nimmt mit steigender Phoressestromstärke ab, die Steilheit der Entladungsfrequenzzunahme und der Endwert der erreichten Entladungsfrequenz nehmen zu. In Abb. 3 B sind die 10 s nach Anschalten der Glut-Phoresseströme erreichten Entladungsfrequenzen gegen die verwendeten Stromstärken aufgetragen. Es ergibt sich eine sigmoidale Dosis-Wirkungsbeziehung mit flachem Anstieg bis etwa 50 nA, einem steilen Schenkel zwischen 50 und 90 nA und einer Sättigung um 100 nA. Mit 110 nA (X in der Abb. 3 B) freigesetztes Glut löste hochfrequente Entladungen aus, in Anstiegsphase und Amplitude vergleichbar der in A dargestellten Stromstärke von 88 nA. 14 s nach Anschalten des Stromes (110 nA) hörte die Entladungstätigkeit auf, Glut konnte keine Aktionspotentiale mehr auslösen, die Zelle befand sich im Depolarisationsblock (s. 3.2.1. und Abb. 6 B). 8 s nach Abschalten des Phore-

sestomes kehrte die Entladungstätigkeit mit einer Frequenz von 150 Imp/s zurück. Der weitere Verlauf des Abklingens der Wirkung entsprach dem Wert bei 88 nA.

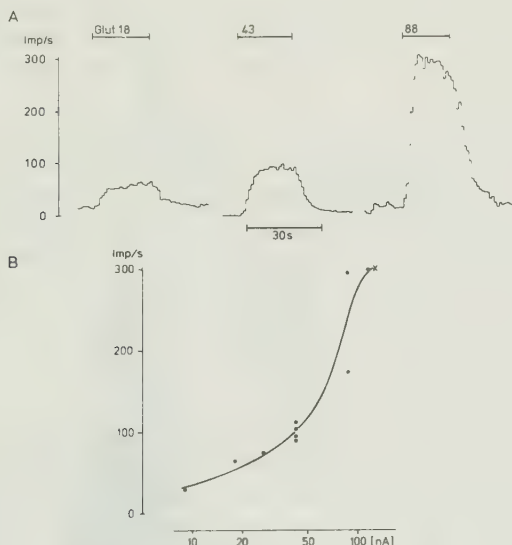


Abb. 3: Beziehung zwischen der Phoresesestromstärke und der Wirkung von Glut auf die extrazellulär registrierte Entladungsfrequenz eines rubrospinalen Neurons

- A: Vom Oscilloscop wurden die Aktionspotentiale einem Frequenzzähler eingegeben und die Entladungsfrequenz mit einem Schreiber analog über die Zeit (Imp/s) aufgezeichnet. Die Länge der Balken entspricht der Freisetzungszeit der Aminosäure, die Zahlen geben die Iontophoresesestromstärke in nA an. Diese Darstellungsweise ist in allen folgenden Abbildungen beibehalten.
- B: Halblogarithmische Auftragung der 10 s nach Anschalten der Glut-Phoreseseströme erreichten Entladungsfrequenzen (Imp/s) gegen die Iontophoresesestromstärke (nA). Mit 110 nA (X) freigesetztes Glut führte zu einem Depolarisationsblock der Zelle.
- Die Messung wurde mit einer Elektrode durchgeführt, bei welcher der Spitzenabstand von Ableitelektrode und Phoresiselektroden 15 μm betrug, der Widerstand der Ableitelektrode war 1 M Ω .

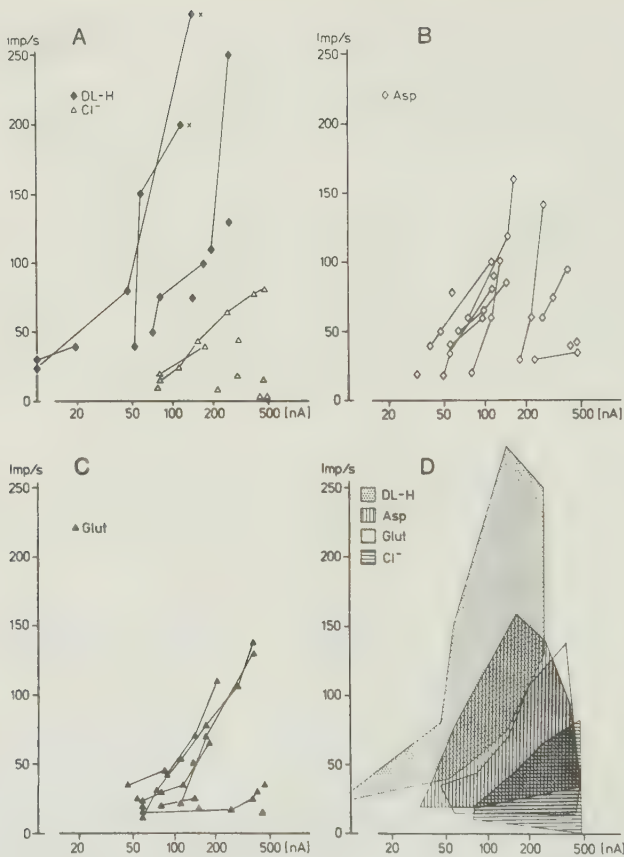


Abb. 4: Beziehung zwischen der Phoresesestromstärke und der Wirkung der Aminosäuren Glut, Asp und DL-H, sowie anionischer Kontrollströme, gemessen an der extrazellulär registrierten Entladungsfrequenz von 22 rubrospinalen Neuronen

An 22 Zellen wurde mit Iontophoreseelektroden, die zu intrazellulärer Ableitung geeignet waren (s. 2.6.) extrazellulär die erregende Wirkung der Aminosäuren an Hand der Entladungsfrequenz gemessen. Durch Linien verbundene Zeichen geben Untersuchungen an einem Neuron wieder, Einzelpunkte entsprechen Einzelwerten an einer Zelle. Die 10 s nach Beginn der Freisetzungsströme erreichte Entladungsfrequenz (Imp/s) wurde halblogarithmisch gegen die Phoresesestromstärke (nA) aufgetragen.

A: Wirkung von DL-H (geschlossene Rauten) und anionischen Cl^- -Kontrollströmen (offene Dreiecke) an insgesamt 13 Zel-

Die Aminosäure Glut, Asp und DL-H hatten an rubrospinalen Neuronen unterschiedlich starke erregende Wirkungen, auch wenn gleichgroße Iontophoreseströme angewandt wurden.

Die Abb. 4 gibt Untersuchungen an 22 Zellen wieder, an denen die Wirkung einer Aminosäure mindestens mit der Wirkung einer anderen oder der eines anionischen Kontrollstromes verglichen werden konnte.

In A ist die Wirkung von DL-H und Cl^- -Kontrollströmen an 13 Neuronen gezeigt. Mit ansteigenden Phoreseströmen von DL-H nimmt die spontane Entladungsfrequenz von 5 Neuronen deutlich zu, zwei Zellen befanden sich bei 200 bzw. 280 Imp/s im Depolarisationsblock (s. 3.2.1. und Abb. 6B). Bei 2 Neuronen hatten hohe anionische Ströme keine erregende Wirkung, 7 Neurone konnten jedoch zu spontanen Entladungen angeregt werden, wovon eines die schrittweise Erhöhung der Cl^- -Stromstärke auf 520 nA mit einer Frequenz bis zu 80 Imp/s beantwortete. Dieses Neuron entlud unter vergleichbaren Glut-Phoreseströmen aber mit etwa doppelter Frequenz. Bei den 6 anderen Zellen konnte der Kontrollstrom nicht mehr als 35 % der Entladungsfrequenz erreichen, die durch vergleichbare Phoreseströme der Aminosäuren hervorgerufen wurden.

In D ist der erregende Effekt von Asp an insgesamt 14 Neuronen gezeigt. Bei 8 Zellen nahm die Frequenz mit ansteigendem Phoresestrom deutlich zu, während 3 Neurone trotz hoher Phoreseströme nur zu Entladungen von etwa 35 Imp/s angeregt wurden (s. 4.1.). Aus C ist ersichtlich, daß bei Applikation von

len. An den mit (X) bezeichneten Punkten (200 Imp/s und 280 Imp/s) befanden sich beide Neurone im Depolarisationsblock.

B: Erregende Wirkung von Asp (offene Rauten) an 14 Zellen.
C: Erregende Wirkung von Glut (geschlossene Dreiecke) an 13 Zellen.

D: Die Umhüllenden der Meßpunkte von A, B und C wurden übereinander projiziert. DL-H ist durch ein grobes Raster gekennzeichnet, Asp durch vertikale Striche, Glut durch ein feines Raster und die Meßwerte der Cl^- -Kontrollströme durch horizontale Striche.

Glut, verglichen zu den Wirkungen von Asp und DL-H, der steile Anstieg der Frequenzzunahme von 5 Neuronen erst bei höheren Phoresestromstärken erfolgt.

Um die an der Iontophoresestromstärke gemessene unterschiedliche Wirkstärke von DL-H, Asp, Glut und Cl^- -Ionenströmen zu verdeutlichen, wurden in dem Diagramm D die Umhüllenden der Messpunkte von A, B und C übereinander projiziert. Die unter DL-H gewonnenen Meßwerte kommen mit denen unter Glut und Cl^- -Ionenströmen nicht zur Deckung. DL-H zeigt an den untersuchten Neuronen eine eindeutig stärkere Wirkung als Glut, oder auch als Kontrollströme gleicher Stärke; die Wirkung von Asp scheint zwischen der von Glut und DL-H zu liegen. Eine Beteiligung des anionischen Phoresestroms an der erregenden Wirkung der Aminosäuren muß insbesondere bei höheren Stromstärken immer ausgeschlossen werden, wie sich aus Kontrollen mit Cl^- -Strömen ergibt.

3.2. Wirkung der Aminosäuren bei intrazellulärer Ableitung

3.2.1. Beeinflussung des Membranpotentials

Die Aminosäuren Asp, Glut und DL-H depolarisieren reversibel rubrospinale Neurone. Asp wurde an 36 Zellen untersucht, von denen 32 depolarisiert wurden; an 4 Neuronen hatte Asp keine Wirkung. Von 52 rubrospinalen Zellen ließ sich bei 35 eine depolarisierende Wirkung von Glut nachweisen. DL-H depolarisierte 23 Neurone; bei 3 Zellen konnte kein Effekt gesehen werden.

Verglichen mit gleichgroßen Iontophoresestromstärken war auch bei intrazellulärer Messung die depolarisierende Wirkung der Aminosäuren unterschiedlich ausgeprägt. In Abb. 5A ist das mit einem Mingograph kontinuierlich aufgezeichnete Membranpotential eines Neurons dargestellt, das Ruhepotential der Membran betrug -55 mV . Unter Freisetzung von Asp und Glut mit gleichen Iontophoreseströmen von 140 nA depolarisiert die

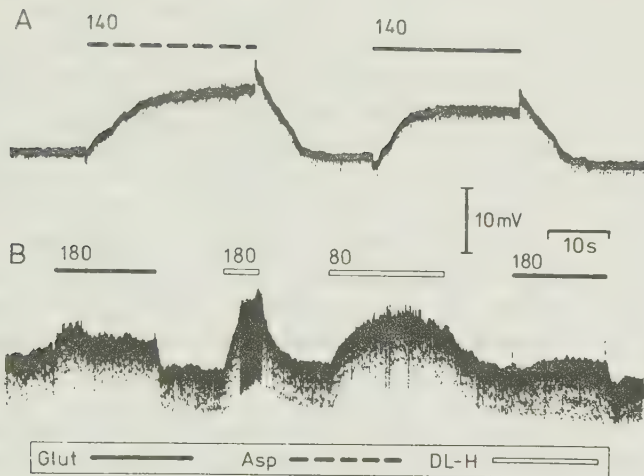


Fig. 5: Wirkungen von Glut, Asp und DL-H auf das Membranpotential von 2 Neuronen

- A: Kontinuierliche Registrierung des Membranpotentials unter Einwirkung von Asp (unterbrochener Balken) und Glut (durchgehender Balken).

Eine Auslenkung der Registrierung nach unten bedeutet Negativität. Diese Darstellungsweise ist in allen folgenden Abbildungen beibehalten.

- B: Kontinuierliche Registrierung des Membranpotentials unter Einwirkung von Glut und DL-H (offener Balken). DL-H wurde mit zwei verschiedenen Stromstärken freigesetzt. Die senkrecht von der Membranpotentialregistrierung nach unten verlaufenden Linien entsprechen den Nachhyperpolarisationen von Aktionspotentialen, die durch antidrome Reize evoziert worden waren (Reizfrequenz 5/s). Die schnelle De- und Repolarisationsphase der Aktionspotentiale konnte vom Schreiber (Mingograph) nicht erfaßt werden.

Zelle, nach Abschalten der Ströme repolarisiert sie auf den Ausgangswert. Die Sprünge des Membranpotentials bei An- und Abschalten der Phoreseströme sind elektrische Kopplungsartefakte zwischen Ableitelektrode und Iontophoresekapillaren (s. 4.1.), sie geben Beginn und Ende des Stromflusses an. Die depolarisierende Wirkung von Asp beginnt nach 0,5 s mit

langsamem Anstieg, ein Sättigungswert der Wirkung wird annähernd erreicht. Nach 25 s beträgt die Amplitude der Depolarisation 11,5 mV. Nach Abschalten des Phoresestromes kehrt das Membranpotential innerhalb von 12 s auf den Ausgangswert zurück. 1,5 s nach Glut-Applikation beginnt die depolarisierende Wirkung, nach 10 s erreicht sie mit 8,5 mV einen Plateauwert, der unter dem der Asp-Wirkung liegt. Nach Beendigung der Glut-Freisetzung wird das Ruhemembranpotential in 12 s wieder erreicht. Die hier gezeigte geringfügig stärkere depolarisierende Wirkung von Asp konnte an 18 Neuronen bestätigt werden. Bei 3 weiteren Zellen war die Wirkung beider Aminosäuren etwa gleich groß, an einer depolarisierte Glut stärker als Asp.

In Abb. 5 B wurden an einem Ruberoneuron, das ein Ruhemembranpotential von -60 mV hatte, die Wirkungen von Glut und DL-Homocysteat (DL-H) miteinander verglichen. Glut, mit 180 nA appliziert, depolarisiert die Zellmembran um 5 mV. DL-H, mit gleicher Stromstärke freigesetzt, depolarisiert schnell um ca. 11 mV; die Zelle beginnt hochfrequent zu entladen, deutlich erkenntlich an der zunehmenden Frequenz der Nachhyperpolarisationen der DL-H-induzierten Aktionspotentiale, die sich den reizinduzierten Entladungen überlagern. Eine zweite Applikation von DL-H mit 80 nA depolarisiert die Membran maximal um 8 mV. Die Erregungsschwelle der Spontan-Entladungen wird in diesem Falle nicht erreicht. Auffällig ist der deutlich langsamere Zeitgang der Repolarisation nach Abschalten des Phoresestromes von DL-H verglichen zu Glut (s. auch Abb. 15 B und 4.3).

An 16 Neuronen konnte DL-H bei intrazellulärer Ableitung mit den physiologischen Aminosäuren Glut und Asp verglichen werden, bei 14 hatte es eine deutlich stärkere exzitatorische Wirkung als Glut und Asp.

Da alle Aminosäuren negativ geladen waren, wurden sie mit anionischem Stromfluß freigesetzt. Kontrollen mit Cl^- -Ionenströmen hatten an 15 Zellen, abgesehen von elektrischen Kopplungsartefakten, keine Wirkung, an 5 Zellen konnten Depolarisationen gesehen werden, die aber immer geringer waren als die der Aminosäuren (s. 4.1.).

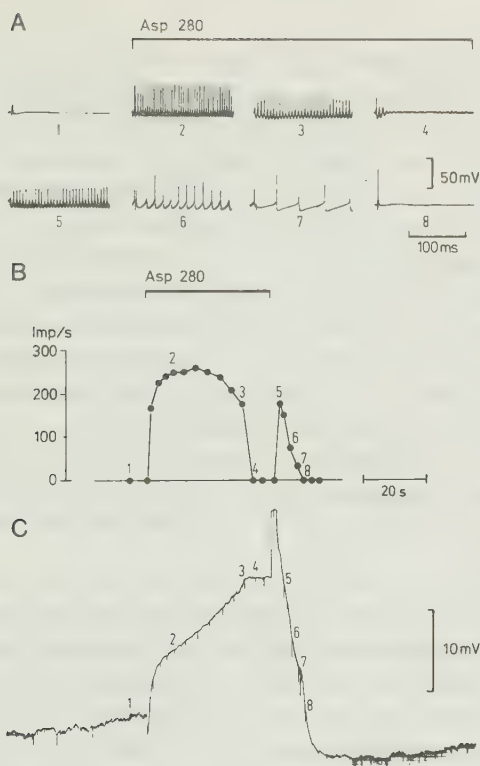


Abb. 6: Hochfrequente Entladungen und Depolarisationsblock eines Neurons unter der Einwirkung von Asp

- A:** Einzelne Oscilloscopedurchläufe, die zusammen mit der Reizung des N. interpositus ($200 \mu\text{A}$ für $0,1 \text{ ms}$) ausgelöst wurden. Die Zahlen der Bilder entsprechen denen in B und C. Beim Ruhemembranpotential (1) von -57 mV löst der Reiz ein einzelnes Aktionspotential aus. Unter Einwirkung von Asp (280 nA) entlädt die Zelle spontan mit hoher Frequenz (2,3), im Sättigungswert der Depolarisation (4) löst der Reiz nur mehr ein Aktionspotential aus, dem 2 abortive Signale folgen. Mit zunehmender Depolarisation (s.C) verringert sich die Amplitude der Aktionspotentiale, nach Abschalten von Asp (5-8) erreichen sie mit ansteigendem Membranpotential ihre Ausgangsgröße.
- B:** Mit gleicher Zeitachse wie in C ist die Entladungsfrequenz des Neurons (Imp/s) aufgetragen. Noch unter Freisetzung von Asp hören die Spontanentladungen auf, die Zelle befindet sich im Depolarisationsblock (4). Nach Abschalten des Phoresesstromes setzen die Entladungen

Die Abb. 6 zeigt die intrazelluläre Ableitung aus einem Neuron, das ein Ruhemembranpotential von -57 mV hatte. In C ist die Registrierung des Membranpotentials wiedergegeben. Unter Freisetzung von Asp mit 280 nA (Markierung und Zeitachse wie in B) sinkt das Membranpotential rasch ab, nach 27 s ist mit 20 mV die maximale Depolarisation erreicht, die bis zur Beendigung der Asp-Applikation unverändert bleibt. Der Potentialsprung bei Ausschalten des Phoresestromes ist deutlich größer als der umgekehrte Anschaltartefakt. Für die Dauer von $1,5$ s nach Beendigung der Asp-Applikation bleibt das Membranpotential gleich, dann steigt es innerhalb von 9 s auf den Ausgangswert, in den folgenden 7 s auf ein um 4 mV höheres Potential an, das nur langsam abfällt. Ohne Berücksichtigung dieser lange andauernden Hyperpolarisation beträgt die Amplitude der Repolarisation nach Abschalten des Asp-Phoresestromes 26 mV.

Während der durch Asp hervorgerufenen Depolarisation entlud die Zelle mit frequenten Aktionspotentialen, die von dem Schreiber (Multicorder) nicht erfaßt werden konnten. Die Zahlen geben den Zeitpunkt an, an dem zusammen mit der Reizung des N. interpositus die in Abb. 6A dargestellten Strahldurchläufe des Oscilloscops ausgelöst wurden. Die Entladungsfrequenz (Imp/s) ist in Abb. 6 B entsprechend dem Zeitverlauf des Membranpotentials (C) aufgetragen.

mit 180 Imp/s wieder ein, die Frequenz nimmt kontinuierlich ab, bis bei Erreichen des Ausgangspotentials der Zelle ein Aktionspotential nur mehr durch Reizung auszulösen ist (8).

C: Kontinuierliche Membranpotentialregistrierung: Die senkrechten strichförmigen Auslenkungen der Potentialschreibung entsprechen elektrischen Artefakten, die sich bei Reizung des N. interpositus auf die Ableitung übertragen. Die Zeitachse der Registrierung und die Kennzeichnung der Asp-Freisetzung entsprechen der Darstellung in B.

Beim Ruhemembranpotential löst der Reiz synaptisch ein einzelnes Aktionspotential aus (A1). Die durch Asp ausgelöste Depolarisation überschreitet rasch die Entladungsschwelle der Zelle, die Spontanentladungen erfolgen mit hoher Frequenz, bei einer Depolarisation von 10 mV (2) beträgt sie 250 Imp/s. Vom Maximalwert (265 Imp/s) an nimmt die Frequenz erst langsam, dann immer deutlicher ab, im Sättigungswert der Depolarisation werden durch Asp keine spontanen Aktionspotentiale mehr hervorgerufen, die Zelle befindet sich im Depolarisationsblock (4). 4 s nach Abschalten des Phoresesstromes, während der steilen Repolarisationsphase, setzen die Spontanentladungen mit 180 Imp/s wieder ein (5), die Frequenz nimmt rasch ab, bis beim Ausgangswert des Membranpotentials (8) ein Aktionspotential nur mehr durch Reiz (A8) ausgelöst werden kann.

Wie in Abb. 6 A gezeigt ist, verringert sich unter der Einwirkung von Asp die Amplitude der Aktionspotentiale mit zunehmender Depolarisation, im Sättigungswert (4) löst der synaptische Reiz ein Aktionspotential aus, das etwa die Hälfte der Ausgangsgröße hat und dem nur noch zwei abortive Signale folgen. In der Repolarisationsphase vergrößern sich die Aktionspotentiale, die Entladungsfrequenz verringert sich kontinuierlich. Bei Erreichen des Ausgangspotentials der Zelle entspricht die Amplitude des synaptisch evozierten Aktionspotentials (8) dem Kontrollwert (1).

3.2.2. Abhängigkeit der Wirkung von der Iontophoresestromstärke

Die freigesetzte Menge und damit die extrazelluläre Konzentration einer Substanz ist abhängig von der Stärke des verwendeten Iontophoresesstromes (s. 4.1.). Für alle Aminosäuren konnte eine Abhängigkeit der depolarisierenden Wirkung von der Phoresesstromstärke gesehen werden.

In Abb. 7 ist eine Dosiswirkungsbeziehung für Asp an einer Zelle dargestellt. Die in A abgebildete Registrierung (Ruhemembranpotential - 60 mV) zeigt die exzitatorische Wir-

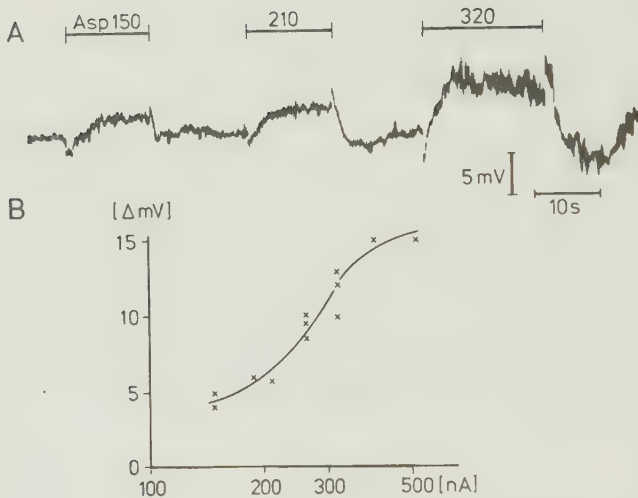


Abb. 7: Beziehung zwischen der Phoresestromstärke und der Wirkung von Asp auf das Membranpotential eines Neurons

- A: Kontinuierliche Registrierung des Membranpotentials eines rubrospinalen Neurons unter Einwirkung von Asp, freigesetzt mit drei verschiedenen Phoresestromstärken.
- B: Halblogarithmische Auftragung der Depolarisationsamplituden (ΔmV) von 12 Messungen gegen die verwendete Iontophoresestromstärke (nA). Die Freisetzung von Asp begann jeweils bei einem Membranpotential von $-60 mV$, nach Abschalten der Phoreseströme wurde dieses Potential innerhalb von 4-20 s wieder erreicht.

kung der Aminosäure bei drei unterschiedlichen Stromstärken. Asp, mit 150 nA appliziert, depolarisiert die Membran um 4,5 mV, mit 210 nA um 5,5 mV und mit 320 nA um 10 mV. Mit ansteigenden Phoresestromstärken nimmt die Latenz des Wirkungseintritts ab, die Steilheit der depolarisierenden Wirkung dagegen zu. Gut zu sehen ist eine bis 12 s dauernde Hyper-

polarisation der Zellmembran nach Beendigung der Asp-Freisetzung mit 210 und 320 nA.

In der Abb. 7 B sind die durch Asp ausgelösten Depolarisationen gegen die verwendeten Stromstärken aufgetragen. Bei allen Messungen war das Ausgangspotential -60 mV und wurde nach Beendigung der Asp-Einwirkung wieder erreicht. Ausgewertet ist jeweils die nach 10 s im Plateau erreichte Amplitude der Depolarisation.

3.2.3. Abhängigkeit der Wirkung vom Membranpotential

Toyama und Mitarbeiter (1968) konnten zeigen, daß das durch Reizung des N. interpositus an rubrospinalen Neuronen evozierte monosynaptische EPSP in seiner Amplitude vom Membranpotential abhängig ist. Hyperpolarisierung der Membran vergrößerte, Depolarisierung verkleinerte die EPSP-Amplitude. Ein Umkehrpotential dieses EPSP's wurde bei einem Membranpotential von -15 mV bis 0 mV angegeben.

In den hier vorgelegten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß auch die Amplitude der Aminosäuren-Depolarisationen vom Ausgangspotential der Membran abhängt. In Abb. 8 A sind Membranpotentialableitungen einer Zelle unter Einwirkung von Asp gezeigt. Der mittlere Ausschnitt illustriert die Depolarisation der Zelle bei einem Ruhemembranpotential von -50 mV, der Widerstand der Membran betrug 2,7 M Ω . Asp, mit 180 nA Iontophoresestrom freigesetzt, verringert das Membranpotential reversibel um 10,5 mV (schnelle Kopplungs-Artefakte bei Ein- und Ausschalten des Stromes). Bei dem links dargestellten Membranpotentialausschnitt wurde die Membran hyperpolarisiert: der durch die Ableitelektrode gegebene Gleichstrom (dc) von -3 nA erhöhte das Membranpotential um ca. 8 mV (nicht illustriert). Die Amplitude der von diesem Potential ausgehenden Asp-Depolarisation vergrößert sich dadurch auf 15 mV. Im ansteigenden Schenkel der Depolarisation entlädt die Zelle, erkenntlich an den Nachhyperpolarisationen der Aktionspotentiale. Durch Gleichstrom von +3 nA wurde die Zellmembran umgekehrt um ca. + 8 mV vordepolarisiert (nicht illustriert).

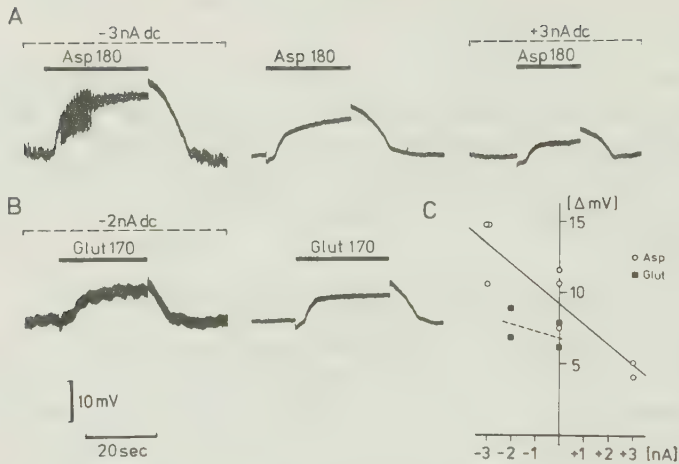


Abb. 8: Abhängigkeit der Glut- und Asp-Wirkung vom Ausgangswert des Membranpotentials eines Neurons

- A: Registrierung der Wirkung von Asp (180 nA) auf das Membranpotential. Mit intrazellulärer Stromgabe (dc) wurde das Ruhemembranpotential (mittlere Abbildung) erhöht (-3 nA dc, links) und erniedrigt (+3 nA dc, rechts).
- B: Selbes Neuron wie in A. Membranpotential-Ableitung unter Einwirkung von Glut (170 nA) bei Ruhemembranpotential (rechte Abb.) und erhöhtem Membranpotential (-2 nA dc, links).
- C: Die Depolarisations-Amplituden (ΔmV) wurden gegen die polarisierenden Ströme (nA) aufgetragen. 8 Messungen von Asp (offene Kreise) sind durch eine Regressionsgerade (ausgezogene Linie) dargestellt. In 4 Messungen von Glut (geschlossene Rechtecke) wurden die Mittelwerte durch eine gestrichelte Linie verbunden.

Wie aus dem dritten Membranpotentialausschnitt in A gesehen werden kann, verringert sich unter dieser Bedingung der Endwert der Asp-Depolarisation auf 5 mV. Nach Beendigung der intrazellulären Stromgabe erreichte das Ruhemembranpotential jeweils wieder den Ausgangswert.

In Abb. 8 B wird eine an derselben Zelle vorgenommene Untersuchung für Glut gezeigt. Ausgehend vom Ruhemembranpotential von -50 mV depolarisiert Glut, in vergleichbarer Stromstärke wie Asp appliziert, um 6 mV, bei Hyperpolarisation der Membran mit 2 nA Gleichstrom wächst die Amplitude auf 7,5 mV an.

An der Zelle der Abb.8 gelangen 8 Untersuchungen der Asp-Wirkung bei 3 verschiedenen Membranpotentialwerten. Im Diagramm C wurden die nach 20 s Wirkdauer von Asp und Glut gemessenen Depolarisations-Amplituden (Δ mV) gegen die polarisierenden Ströme (nA) aufgetragen. Die ausgezogene Linie ist eine errechnete Regressionsgerade der Asp-Werte, der Regressionskoeffizient beträgt 0,88. Die gestrichelte Linie ist die Verbindung der Mittelwerte der an dieser Zelle gemessenen Glut-Depolarisationen.

3.2.4. Beeinflussung der Membranleitfähigkeit

Die depolarisierenden Wirkungen der Aminosäuren Glut, Asp und DL-H waren von einer Leitfähigkeitszunahme der Membran begleitet. Um Widerstandsänderungen der Neuronenmembran zu messen, wurden stromkonstante Pulse von 1-10 nA und 5-15 ms Dauer durch die intrazelluläre Ableitelektrode gegeben. Derartige Pulse rufen über der Membran ein elektrotonisches Potential gleicher Dauer hervor. Die zu erwartenden Polarisationen stellen sich mit einer für biologische Membranen charakteristischen Zeitkonstante ein, die sich aus dem Produkt von Widerstand und Kapazität der Membran errechnet ($R \times C$). Ist der Elektrodenwiderstand vor Einstich in die Zelle kompensiert (s.2.8.) läßt sich aus dem Strompuls-induzierten elektrotonischen Spannungssprung der Membranwiderstand nach dem Ohmschen Gesetz berechnen. Eine Verkleinerung des Spannungssprunges bedeutet eine Widerstandsabnahme der Membran; gleichzeitig verringert sich die Zeitkonstante, wenn die Membrankapazität konstant bleibt, was zu erwarten ist (s.4.3).

In Abb. 9 ist an einem Ruberneuron die Bestimmung der Membranleitfähigkeit unter Ruhebedingungen sowie unter Einwirkung von Glut und Asp dargestellt. In A wurden jeweils 5 bis 10 Oscilloscopedurchläufe übereinander photographiert. Ein konstanter Strompuls von -2 nA und 10 ms Dauer erzeugte unter "Ruhe"-Bedingungen einen Spannungssprung von 11 mV , er ist für alle drei Kontrollmessungen gleich. Daraus errechnet sich der Membranwiderstand zu $5,5 \text{ M}\Omega$. Bei Gabe von Glut mit 8 nA Phoresestrom verringert sich die Amplitude des elektrotonischen Potentials auf 8 mV , mit $7,5 \text{ nA}$ appliziertes Asp verkleinert die Amplitude geringfügig stärker auf $7,3 \text{ mV}$. Der Membranwiderstand beträgt während der Glut-Einwirkung $4 \text{ M}\Omega$, während Asp-Freisetzung $3,6 \text{ M}\Omega$. Eine Stromkontrolle mit einem Chloridstrom von 13 nA (Glut und Asp wurden anionisch freigesetzt) hatte keinen Einfluß auf die Amplitude des elektrotonischen Potentials, die Leitfähigkeitszunahme ist also durch die Aminosäuren bedingt (nicht illustriert).

In Abb. 9 B ist die Geschwindigkeit der Spannungsänderung (V/s) in der Anstiegsphase der in A illustrierten elektrotonischen Potentiale halblogarithmisch gegen die Zeit (ms) aufgetragen. Die Werte der übereinander photographierten Oscilloscopedurchläufe wurden gemittelt, die dV/dt -Werte der Kontrollen in ms -Schritten gemessen, die Aminosäurenwerte in $1/2 \text{ ms}$ -Schritten. Die aufgetragenen Punkte der 3 Kontrollen lassen sich von 4 ms an gut durch eine Gerade τ_M beschreiben. Der negative Abfall der Geraden ergibt eine Zeitkonstante von $2,8 \text{ ms}$ für die Kontrollen. Von den 3 ms -Werten an sind die Meßpunkte unter Glut- und Asp-Wirkung jeweils durch eine Gerade darzustellen; es errechnet sich für Glut eine Zeitkonstante der Membran von $1,9 \text{ ms}$, für Asp von $1,5 \text{ ms}$. Unter der Voraussetzung, daß die Kapazität der Membran sich unter dem Einfluß der Aminosäuren nicht ändert, kann aus der Beziehung Zeitkonstante $\tau = \text{Membranwiderstand (R)} \times \text{Membrankapazität (C)}$ die Leitfähigkeitszunahme errechnet werden. Es ergibt sich so eine geringfügig stärkere Leitfähigkeitszunahme als bei Ausmessung der Puls-Amplituden (Glut: $3,7 \text{ M}\Omega$; Asp: $3 \text{ M}\Omega$).

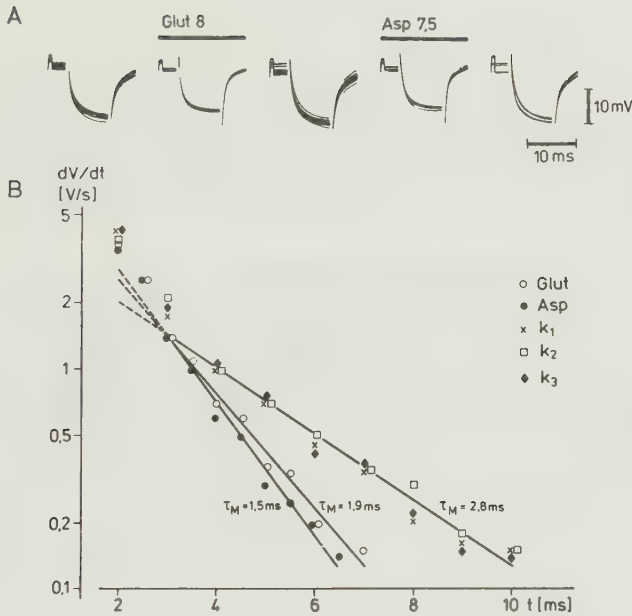


Abb. 9: Bestimmung der Membranleitfähigkeit eines Neurons unter Einwirkung von Glut und Asp

- A: Übereinander photographierte Oscilloscopedurchläufe vor, während und nach der Applikation von Glut (8 nA) und Asp (7,5 nA). Zu Beginn jeden Durchlaufs ein Kalibrierungspuls (2 mV/ms), gefolgt von dem durch einen konstanten Strompuls (-2 nA/10 ms) über dem Membranwiderstand hervorgerufenen elektrotonischem Potential.
- B: Die Geschwindigkeit der Ausbildung der elektrotonischen Potentiale (V/s) wurde halblogarithmisch gegen die Zeit (ms) aufgetragen. Die Werte der Kontrollen (K_1 , K_2 , K_3) wurden in ms-Schritten bestimmt, die Werte unter Aminosäureeinwirkung in 1/2 ms-Schritten. Es ergeben sich drei Geraden mit den Zeitkonstanten $\tau_M = 2,8$ ms für die Kontrollen, $\tau_M = 1,9$ ms unter Glut und $\tau_M = 1,5$ ms unter Asp.

Das elektrototonische Potential gehorcht in den ersten Millisekunden zusätzlich einem steileren exponentiellen Verlauf mit einer kleineren Zeitkonstante, diese wird nicht dem RXC Glied der Membran zugerechnet (s. 4.3).

Insgesamt wurden an 18 Neuronen Leitfähigkeitszunahmen unter der Einwirkung der Aminosäuren festgestellt. Bei 6 Zellen war die Leitfähigkeitszunahme zwischen 20 und 45 %, bei 3 Neuronen war keine Leitfähigkeitsänderung festzustellen.

3.2.5. Beeinflussung synaptischer Potentiale

Unter der Wirkung der Aminosäuren verkleinerten sich durch Reizung synaptisch ausgelöste EPSPs.

Die durch Reizung des sensomotorischen Cortex an einer rubrospinalen Zelle hervorgerufenen EPSPs sind in Abb. 10 A dargestellt. In der ersten Abbildung ist zu sehen, daß der Doppelreiz EPSPs auslöst, die teilweise die Schwelle der Entladung erreichen. Die Amplitude der postsynaptischen Potentiale beträgt im Mittel 2,5 mV, von den Aktionspotentialen ist nur ein Teil der schnellen Depolarisations- und Repolarisationsphase abgebildet. Unter Gabe von Asp mit 180 nA verringert sich das EPSP auf 1,5 mV. Die Auslösung von Aktionspotentialen ist verhindert. Die Abbildung wurde vor Beginn der in B gezeigten frequenten Spontanentladungen gewonnen. Der anschließende Kontrollwert zeigt EPSPs von 2,2 mV, die Amplitude von 3 postsynaptischen Potentialen beträgt 2,7 bzw. 3,5 mV. Der Doppelreiz löst keine Aktionspotentiale aus. Unter Glut (170 nA) verringert sich das EPSP während der Sättigung der Depolarisation auf 1,3 mV. Nach Abschalten des Glut-Freisetzungsstromes und nach Rückkehr des Membranpotentials auf den Ausgangswert beträgt das EPSP 1,8 - 2,5 mV, teilweise wird die Entladungsschwelle wieder erreicht. Ein Cl^- -Ionenstrom (s.B) hatte keinen Einfluß auf das corticale EPSP, es entsprach den Kontrollwerten (nicht illustriert).

In Abb. 10 B ist das gleichzeitig registrierte Membranpotential dieser Zelle fortlaufend aufgezeichnet, das Ruhemembranpotential betrug -55 mV. Asp hat auch an diesem Neuron eine

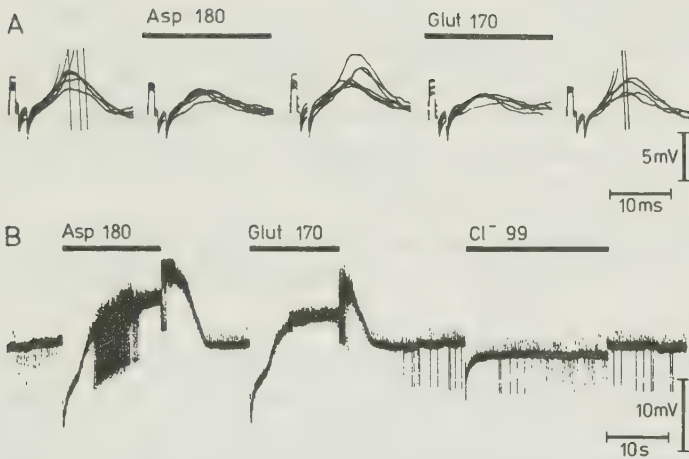


Fig. 10: Beeinflussung des corticalen EPSP's durch Glut und Asp

- A: Durch Reizung des sensomotorischen Cortex (Doppelreiz von 5 V, 4 Hz) ausgelöste EPSPs und Teile von Aktionspotentialen sind dargestellt. 5-7 Strahlendurchläufe des Oscilloscops sind übereinanderphotographiert. Der Kalibrierungspuls zu Anfang jeden Strahlendurchgangs beträgt 2 mV für 1 ms. Die Abbildungen wurden gleichzeitig mit der in B gezeigten Membranpotentialregistrierung gewonnen.
- B: Membranpotentialregistrierung des selben Neurons wie in A. Das Ruhemembranpotential betrug -55 mV. Die senkrecht nach unten verlaufenden Linien entsprechen den Nachhyperpolarisationen der Aktionspotentiale, die zum Teil durch synaptische Stimulierung oder durch die Depolarisation unter Asp spontan ausgelöst wurden (s.A.). Deutlich zu sehen sind die Kopplungsartefakte bei An- und Abschalten der Aminosäurenströme und des Kontrollstromes mit Cl⁻-Ionen.

stärkere depolarisierende Wirkung als Glut, die Entladungsschwelle der Membran wird unter Einwirkung von Asp erreicht, erkenntlich an den frequenten Nachhyperpolarisationen, die sich den reizinduzierten überlagern. Das Anschalten der Ionophoreseströme zeigte bei dieser Messung einen größeren Kopplungsartefakt als das Ausschalten. Die Kontrolle mit einem anionischen Cl^- -Strom (99 nA) macht deutlich, daß unabhängig vom negativen Freisetzungsstrom und Kopplungsartefakten die Aminosäuren eine eindeutige depolarisierende Wirkung an der Zellmembran haben (s. 4.1).

Auch DL-H verringerte die Amplitude reizinduzierter postsynaptischer Potentiale, wie in der Abb. 16 gezeigt werden konnte.

An 17 Neuronen wurde die Wirkung der Aminosäuren auf das durch Reizung des N. interpositus ausgelöste EPSP untersucht, es konnte eine Reduktion der Amplitude unter der depolarisierenden Wirkung gesehen werden. Das durch Cortex-Reiz evozierte EPSP wurde an 7 Neuronen unter dem Einfluß der Aminosäuren untersucht, an 5 Zellen wurde es verkleinert, bei zweien zeigte sich keine eindeutige Veränderung.

3.3. Wirkung der Substanzen HA-966 und GDEE

3.3.1. Beeinflussung von extrazellulär gemessenen Entladungsraten

An 18 rubrospinalen Zellen wurde der Einfluß von HA-966 und GDEE auf spontane Entladungen oder auf die durch die Aminosäuren hervorgerufene Erregung untersucht. Beide Substanzen verringerten die Entladungsraten der Neurone.

Die Abb. 11 zeigt die Wirkung von HA-966 auf eine durch Glut zu Entladungen angeregte Zelle. Die durch Glut (43 nA) ausgelöste Frequenzerhöhung ist in A gezeigt. Die Wirkung setzt nach einer Latenz von 2 s rasch ein und erreicht nach 8 s einen

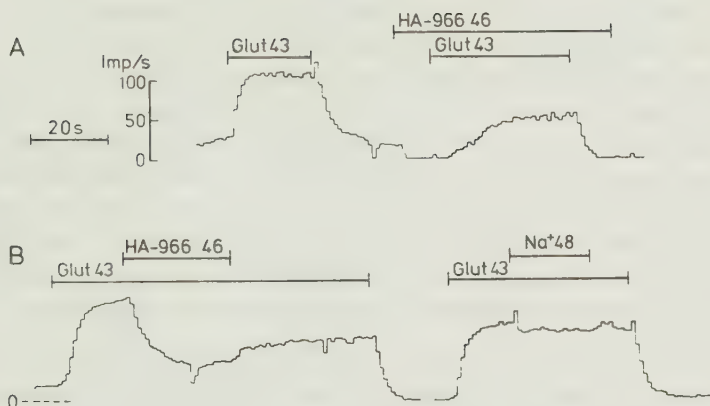


Abb. 11: Hemmende Wirkung von HA-966 auf ein durch
Glut zu Entladungen angeregtes Neuron

- A: Die extrazellulär gemessene Entladungsfrequenz eines rubrospinalen Neurons ist in Imp/s aufgezeichnet. Es ist dasselbe Neuron wie in Abb. 3, die Messung wurde mit der gleichen Elektrode durchgeführt. Glut wurde mit 43 nA freigesetzt, HA-966 mit vergleichbarem kationischem Strom (46 nA).
- B: Selbes Neuron wie in A. Die Kalibrierung und die Zeitachse entsprechen der Darstellung in A, der Nullpunkt ist angegeben. Neben Glut und HA-966 wurde ein Kontrollstrom mit Na⁺-Ionen (48 nA) freigesetzt.

Sättigungswert von etwa 110 Imp/s. Nach Abschalten des Phoresesstromes erfolgt die Frequenzabnahme zunächst schnell, die Ausgangsfrequenz der Spontanentladungen wird erst nach 20 s erreicht. HA-966, mit einer dem Glut-Phoresesstrom vergleichbaren Stromstärke appliziert, blockiert sehr schnell die Auslösung spontaner Aktionspotentiale. Eine erneute Freisetzung von Glut (43 nA) unter gleichzeitiger HA-966 Einwirkung zeigt eine deutliche Hemmung der erregenden Wirkung der Aminosäure. Erst 4 s nach Einschalten des Glut-Phoresesstromes beginnt das Neuron langsam zu entladen, nach 25 s wird eine gleichbleibende Frequenz der Aktionspotentiale von etwa der Hälfte des Glut-Kontrollwertes erreicht, 8 s nach Abschalten des Glut-Phoresesstromes entlädt das Neuron nicht mehr.

In B entlädt das Neuron unter der selben Glut-Stromstärke wie in A mit etwa 120 Imp/s. HA-966, mit 46 nA freigesetzt, reduziert die Entladungsfrequenz auf etwa 50 Imp/s, nach Abschalten des HA-966 Stromes erhöht sich die Frequenz nur geringfügig. Die Ausgangsfrequenz wird während der noch 1 min. andauernden Glut-Freisetzung nicht mehr erreicht. Eine erneute Freisetzung von Glut mit 43 nA nach 40 s regt das Neuron wiederum zu Entladungen von etwa 100 Imp/s an. Ein Na^+ -Ionenstrom von 48 nA verringert die Entladungsrate unwesentlich. Dies bedeutet, daß der kationische Freisetzungsstrom von HA-966 (pH 5,5) in diesem Fall nur unerheblich zur hemmenden Wirkung beiträgt.

Die Abb. 12 illustriert den Vergleich der Hemmwirkung von HA-966 und GDEE an einem durch einen Glut-Strom von 140 nA erregtem rubrospinalen Neuron. In A ist die Entladungsfrequenz wiedergegeben. Das "stumme" Neuron wird durch Glut zu Entladungen angeregt, nach 10 s ist eine Entladungsfrequenz von etwa 40 Imp/s erreicht. GDEE, mit 140 nA freigesetzt, verhindert rasch die Auslösung spontaner Aktionspotentiale durch Glut, nach Abschalten des GDEE-Stromes wird die Ausgangsfrequenz schnell wieder erreicht. Mit 46 nA und 65 nA appliziertes GDEE hat ebenfalls einen eindeutigen Hemmeffekt, das Neuron entlädt mit einer Frequenz von etwa 20 Imp/s. Eine erneute Applikation von GDEE mit 140 nA zeigt eine gleich-

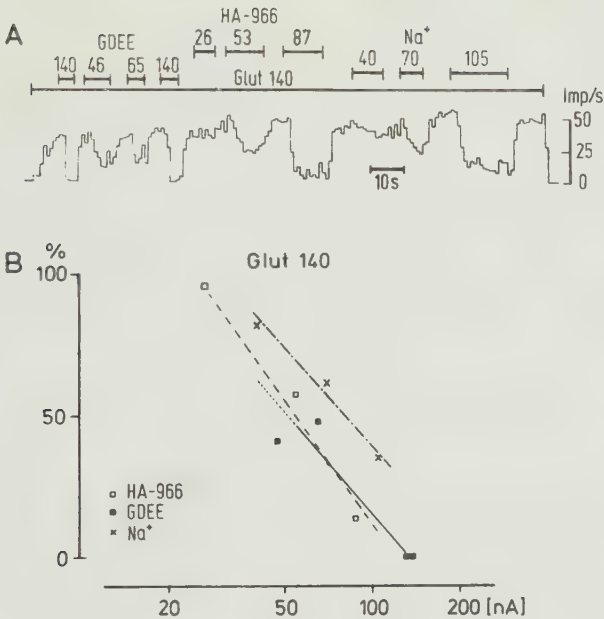


Abb. 12: Vergleich der Hemmwirkung von GDEE und HA-966 an einem durch Glut zu Entladungen angeregten Neuron.
Kontrollströme mit Na⁺-Ionen dienten zur Abgrenzung von Stromartefakten

- A:** Kontinuierliche extrazelluläre Registrierung der Entladungsfrequenz eines rubrospinalen Neurons. Glut wurde über die Zeit der Messung mit 140 nA freigesetzt. GDEE wurde viermal appliziert, HA-966 und Na⁺-Kontrollströme je dreimal. Die Messung wurde mit einer Elektrode durchgeführt, die zu intrazellulärer Ableitung geeignet war.
- B:** Schematische Darstellung der in A gezeigten Hemmwirkung von HA-966 (offenes Quadrat), GDEE (geschlossenes Quadrat) und Na⁺-Ionenströmen (Kreuz). Die unmittelbar vor der Freisetzung der Substanz- und Kontrollströme gemessene Entladungsfrequenz unter Glut wurde als 100 % angenommen, die Reduktion der Entladungen in % gegen die verwendete Phoresestromstärke (nA, logarithmisch) aufgetragen. Die Meßpunkte wurden durch Geraden verdeutlicht (HA-966: gestrichelte Linie; GDEE: ausgezogene Linie; Na⁺-Ionenströme: Strich-Punkt Linie).

starke Wirkung wie zu Anfang. Die Kontrollfrequenz der Entladungen wurde nach Beendigung der GDEE-Freisetzung jeweils wieder erreicht. Anschließend wurde während der fortdauernden Glut-Applikation dreimal HA-966 freigesetzt. Mit ansteigender Stromstärke nimmt die Hemmwirkung der Substanz zu.

GDEE und HA-966 wurden mit kationischem Strom appliziert. Um die Beteiligung der Stromrichtung an den Substanzeffekten er-messen zu können, wurden aus der eine NaCl-Lösung enthalten-den Kapillare Na^+ -Kontrollströme mit ansteigender Stromstärke freigesetzt. Auch Na^+ -Ionenströme bewirkten eine eindeu-tige Verminderung der Entladungsfrequenz, die mit der Strom-stärke zunahm. Nach Abschalten des Glut-Phoresestromes hör-ten die spontanen Entladungen schnell auf.

In der Abb. 12 B ist die Hemmwirkung von GDEE, HA-966 und Na^+ -Ionenströmen an diesem durch Glut erregten Neuron in einem Diagramm wiedergegeben. Da die Entladungsfrequenz des Neurons während der Glut-Freisetzung um etwa 20 % zunahm, wurde die unmittelbar vor der jeweiligen Freisetzung der hem-menden Substanzen gemessene Aktionspotential-Frequenz als 100 % angenommen. Das Verhältnis der gemittelten Entladungsfre-quenz unter Einwirkung einer Substanz zum vorherigen Kontroll-wert wurde in Prozent (%) gegen die verwendete Stromstärke (nA, logarithmisch) aufgetragen. Die für die einzelnen Sub-stanzen gemessenen Werte lassen sich näherungsweise durch Ge-radern darstellen. Es zeigt sich, daß die Wirkung von HA-966 und GDEE nicht wesentlich unterschieden sind. Die Gerade der Na^+ -Ströme läuft annähernd parallel zu den anderen Geraden verschoben. Der eigentliche Hemmeffekt von GDEE und HA-966 wird nach Subtraktion des Stromeffektes erscheinen.

Bei extrazellulärer Ableitung der Entladungen von rubrospinalen Neuronen konnte unter HA-966 und GDEE keine selektive Hemmung der Glut- oder Asp-Erregung gesehen werden, an 7 Neuronen konnte vergleichbar mit den beiden Aminosäuren auch die erre-gende Wirkung von DL-H vermindert werden.

Insgesamt zeigte GDEE bei 13 Neuronen eine hemmende Wirkung. HA-966 wurde entsprechend seiner positiven Ladung bei pH 5,5 an 7 Neuronen mit kationischem Stromfluß freigesetzt, es hemmte

die Entladungen von 6 Zellen, an einer hatte es keinen Effekt.

Bei 14 Zellen wurden Stromkontrollen mit Na^+ -Ionen durchgeführt. GDEE hatte nur bei 6 untersuchten Neuronen eine stärkere Wirkung als gleichgroße Na^+ -Kontrollströme, an 3 Neuronen war es sogar schwächer wirksam. Kationisch freigesetztes HA-966 (pH 5,5) verminderte die Entladungsfrequenz von 5 Neuronen stärker als der Kontrollstrom. Negativ geladenes HA-966 (pH 8-8,5) verminderte die Entladungsfrequenz von 3 Neuronen. Stromkontrollen mit Cl^- -Ionen zeigten keine Hemmwirkung.

3.3.2. Wirkung auf extrazelluläre Feldpotentiale

Bei Reizung des Rückenmarkes und des kontralateralen N. interpositus können im Kerngebiet des N. ruber extracelluläre Feldpotentiale abgeleitet werden, die durch die synchrone Aktivierung der Zellen durch Stimulierung des rubrospinalen Traktes (Antidromes Feldpotential, s. 2.1.) oder durch synaptische Erregung über die interposito-rubralen Fasern (Synaptisches Feldpotential) entstehen (Tsukahara et al. 1967). Die Amplitude der Potentiale ist abhängig von der Anzahl der erregten Neurone und der Lage der Ableitelektrode. Bei unveränderter Elektrodenposition ist häufig eine stabile Ableitung der Massenaktivität über längere Zeit möglich.

Die Abb. 13 zeigt Feldpotentialmessungen, die mit einem Computer aus jeweils 20 Oscilloscopedurchläufen gemittelt wurden (s. 2.3.). 0,9 ms nach Rückenmarkreizung (CC) beginnt das antidrome Feldpotential, der Gipfel von -1,3 mV ist nach 1,05 ms erreicht. Der zweite Pfeil (IP) gibt den Moment des N. interpositus-Reizes an. Nach 0,4 ms Latenzzeit beginnt ein kleineres negatives Potential, das der synchronen Aktivierung der interposito-rubralen Fasern entspricht. Seine volle Amplitude von -0,6 mV erreicht es 0,55 ms nach Reizung. Mit einer Latenz von 0,95 ms beginnt das synaptisch ausgelöste Feldpotential, das innerhalb von 0,2 ms zu voller Amplitude von -1,15 mV anwächst (etwas langsamer als das antidrom evozierte Potential).

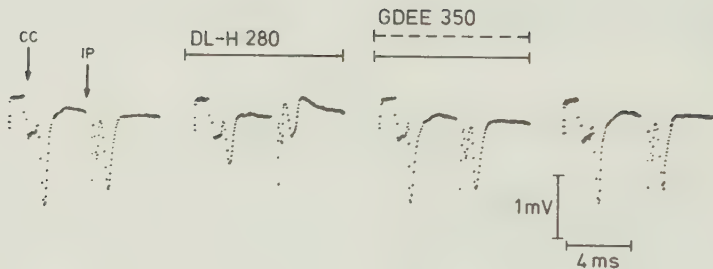


Abb. 13: Einfluß von DL-H auf das extrazellulär gemessene antidrome und synaptische Feldpotential, Hemmung der DL-H Wirkung durch GDEE

Jeweils 20 Oscilloscopdurchläufe sind mit einem Computer gemittelt. Der Kalibrierungspuls beträgt 0.5 mV für 1 ms (Negativität nach unten). Der Pfeil unter CC (cervical cord) kennzeichnet die Reizung des Rückenmarks in Höhe der Segmente C₂/C₃ (10 V für 0,1 ms); der Pfeil unter IP (N. interpositus) gibt den Moment der Reizung des Kleinhirnkernes an (200 µA für 0,1 ms).

Neben der Einwirkung von DL-H auf die Feldpotentiale ist die Interaktion von GDEE mit der DL-H-Wirkung gezeigt (s. Text), außerdem sind Kontrollen vor und nach den Messungen illustriert.

Bei 11 Messungen in 6 Versuchen wurde der Einfluß der Aminosäuren Glut und Asp auf diese extrazellulär abgeleiteten Feldpotentiale untersucht. Die physiologischen Aminosäuren verkleinerten in 7 Messungen das synaptische Feldpotential um 10-25 %, das antidrome Feld wurde in geringerem Maße beeinflusst. Bei 4 Untersuchungen konnten keine eindeutigen Effekte nachgewiesen werden. Die Wirkung von DL-H wurde in 4 Versuchen mit der von Glut oder Asp verglichen. Wie im 2. Bild der Abb. 13 gezeigt wird, kam es zu einer deutlichen Verkleinerung beider Feldpotentiale: DL-H (280 nA, 1 Minute) verringerte das antidrome Potential auf 0,7 mV (55 % der Kontrolle), das synaptische auf 0,5 mV (45 % der Kontrolle). Der Ausgangswert wurde erst 2 Minuten nach Abschalten des Phoresestromes wieder erreicht (nicht illustriert).

GDEE und HA-966 wurden bei 6 derartigen extrazellulären Ableitungen untersucht. Während GDEE keinen konstanten Einfluß auf die Feldpotentiale hatte, verkleinerte HA-966 das synaptische Potential um etwa 15-25 %, das antidrome Potential wurde nicht beeinflusst. GDEE blockierte jedoch die Wirkung von DL-H. Im 3. Bild der Abb. 13 wurde zuerst GDEE mit 350 nA freigesetzt, nach 30 s DL-H iontophoretisch appliziert. 1,5 Minuten nach Beginn des GDEE-Stromes wurde gemittelt. Das antidrome Feldpotential wurde während der zusätzlichen Ejektion von GDEE durch DL-H nicht verändert, das synaptische gegenüber dem Kontrollwert (1,15 mV) nur geringfügig auf 1 mV verkleinert. Mit einem zusätzlichen Na^+ -Kontrollstrom von 350 nA konnte der im 2. Bild gezeigte Effekt von DL-H auf beide Feldpotentiale hingegen nicht beeinflusst werden (nicht illustriert). Das 4. Bild gibt eine 1 Minute nach Abschalten der Phoreseströme ausgeführte Messung wieder, sie entspricht der ersten Kontrolle.

3.3.3. Wirkung von GDEE bei intrazellulärer Ableitung

In Abb. 14 ist die mit langsamer Schreibung aufgezeichnete Membranpotentialableitung eines rubrospinalen Neurons gezeigt, das ein Ruhemembranpotential von -65 mV hatte. Glut, DL-H und GDEE wurden iontophoretisch freigesetzt und ihre Wirkungen auf das Membranpotential untersucht. Glut, mit 180 nA appli-

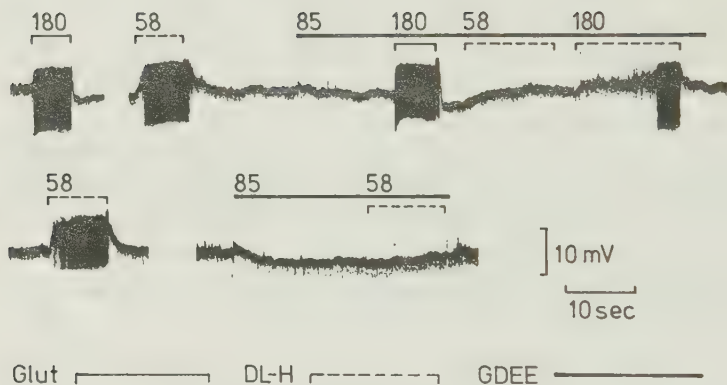


Abb. 14: Wirkung von Glut, DL-H und GDEE bei intrazellulärer Ableitung

Membranpotentialregistrierung eines rubrospinalen Neurons (Ruhemembranpotential: -65 mV). Glut (dünner Balken), DL-H (gestrichelter Balken) und GDEE (dicker Balken) wurden iontophoretisch freigesetzt, die Zahlen geben die Stromstärke in nA an. Die Ausschnitte der Registrierung wurden entsprechend dem Membranpotential angeordnet, der Übergang von der ersten in die zweite Zeile ist kontinuierlich. Die unter der Einwirkung der Aminosäuren ausgelösten frequenten Entladungen können an den vom Mingograph registrierten Nachhyperpolarisationen erkannt werden.

ziert, depolarisiert und regt die Zelle zu hochfrequenten Spontanentladungen an; der Schreiber erfaßte nur die gut sichtbaren Nachhyperpolarisationen der Aktionspotentiale. DL-H, mit 58 nA freigesetzt, depolarisiert und löst ebenfalls hochfrequente Entladungen aus. Die Repolarisation auf den Ausgangswert des Membranpotentials erfolgt nach Abschalten des DL-H Stromes langsamer als nach Beendigung der Glut-Frei-

setzung. Unter GDEE (85 nA) ist die Wirkung von Glut nicht beeinflusst, die Zelle depolarisiert und entlädt mit ähnlicher Frequenz wie in der Kontrollmessung. DL-H, mit gleicher Stromstärke wie in der Kontrolle appliziert, depolarisiert die Membran jedoch nur geringfügig; erst bei Erhöhung des Phoresestromes auf den dreifachen Wert (180 nA) wird die Zelle mit langsamem Zeitgang depolarisiert, so daß sie nach 15 s die Entladungsschwelle erreicht. Die anschließende Kontrollmessung mit der selben Stromstärke wie zu Anfang (58 nA) zeigt die unverändert starke exzitatorische Wirkung von DL-H. Eine Kontrolle mit einem Na^+ -Ionenstrom, vergleichbar dem GDEE-Phoresestrom, hatte keinen Einfluß auf die erregende Wirkung von DL-H (nicht illustriert).

An diesem Neuron konnte demnach keine Hemmung der Glut-Erregung durch GDEE gesehen werden, dagegen wurde die exzitatorische Wirkung der Aminosäure DL-H deutlich gehemmt.

Die Eigenwirkung von GDEE an der Zellmembran ist ebenfalls in Abb. 10 gezeigt. Mit 85 nA appliziert, hyperpolarisiert GDEE die Membran reversibel um 3,5 mV, DL-H mit 58 nA freigesetzt, hat unter Gabe von GDEE keine Wirkung. An 14 Ruberzellen konnte eine hyperpolarisierende Wirkung von GDEE gesehen werden. Kontrollen mit Na^+ -Ionenströmen gleicher Größenordnung ließen bei 12 Zellen ausschließen, daß diese Wirkung durch Stromartefakte verursacht wird, nur an 2 Zellen hatte der Na^+ -Strom einen vergleichbaren Effekt.

3.3.4. Wirkung von HA-966 bei intrazellulärer Ableitung

In der Abb. 15 B ist die Membranpotentialableitung einer rubrospinalen Zelle illustriert, die ein Ruhemembranpotential von -60 mV hatte. Ein 35 s anhaltender DL-H Phoresestrom von 460 nA depolarisiert die Membran um 18 mV, der rapide Anstieg der Wirkung beginnt 3 s nach Einschalten des Stromes. Der Zeitgang der Repolarisation nach Ende des Phoresestromes ist deutlich langsamer, das Ausgangspotential wird erst nach ca. 2,5 min. wieder erreicht. Anschließend wurde HA-966 als Kation mit 460 nA freigesetzt; die depolarisierende Wirkung von DL-H ist dadurch deutlich reduziert, bei glei-

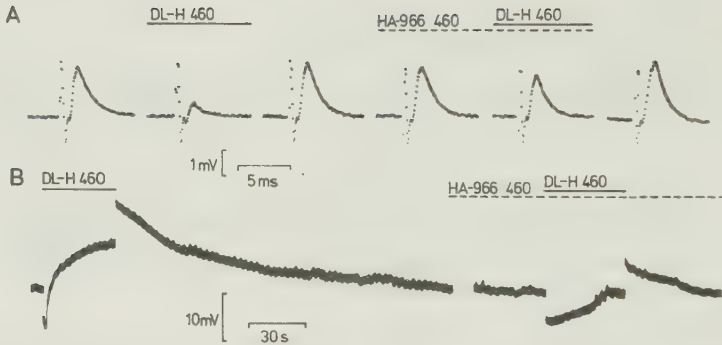


Abb. 15: Beeinflussung der DL-H Wirkung durch HA-966 bei intrazellulärer Ableitung

- A: Mit dem Computer gemittelte EPSPs (15 Durchläufe, die durch Reizung des N. interpositus ($150 \mu\text{A}$ für $0,1 \text{ ms}$) evoziert wurden. Die vertikale Punktreihe stellt den Reizartefakt dar. Es ist die Einwirkung von DL-H und HA-966 gezeigt. Die Messung wurde gleichzeitig mit der in B gezeigten Registrierung des Membranpotentials vorgenommen.
- B: Membranpotentialregistrierung: Das Ruhepotential der Zelle betrug -60 mV . Deutlich zu sehen sind die sprunghaften Artefakte bei Ein- und Ausschalten des DL-H Phoresestromes. Beginn und Ende der HA-966 Freisetzung sind nicht illustriert.

cher Freisetzungszeit wie in der Kontrolle wird die Membran nur mehr um 5,5 mV depolarisiert. Anstieg und Rückgang der Wirkung sind im Zeitverlauf vergleichbar.

Während der in B gezeigten Potentialregistrierung wurde der N. interpositus gereizt. Die an der Zelle ausgelösten EPSPs wurden mit einem Komputergemittelt. Das erste Bild in der Abb. 15 A zeigt den Kontrollwert. Die Latenz der EPSPs nach dem Reiz (vertikale Punktreihe) beträgt 1 ms, die Amplitude 2 mV. Während der in B gezeigten Depolarisation durch DL-H verringert sich das EPSP auf 0,5 mV (Bild 2), nach Ende der DL-H Wirkung, beim Ausgangspotential der Membran, ist die volle Amplitude des Kontrollwertes wieder erreicht (Bild 3). HA-966, mit 460 nA freigesetzt, hat an dieser Zelle nur einen geringen Einfluß auf das EPSP (Bild 4). Jedoch zeigt sich der blockierende Effekt auf die depolarisierende Wirkung von DL-H auch am synaptischen Potential; die Amplitude des EPSP's verringert sich unter DL-H bei gleichzeitiger HA-966-Einwirkung nur mehr auf 1,6 mV (Bild 5). Nach Repolarisation des Membranpotentials auf den Ausgangswert beträgt das EPSP 2,2 mV. HA-966 verringerte bei 5 Zellen, den depolarisierenden Effekt der Aminosäuren, an einer wurde er geringfügig vergrößert.

HA-966 hatte jedoch an den meisten untersuchten rubrospinalen Neuronen eine Eigenwirkung wie aus der Abb. 16 hervorgeht. Es sind Untersuchungen an einer Zelle gezeigt, die ein Ruhemembranpotential von -63 mV hatte. In B ist die Membranpotentialableitung aufgezeichnet. HA-966, mit 460 nA freigesetzt, hyperpolarisiert die Zellmembran um 2,5 mV. Der Zeitgang der Polarisation ist langsam und deutlich zu unterscheiden von den Kopplungsartefakten bei Ein- und Ausschalten des Phoresestromes. Gleichzeitig wurden durch schwelennahe Reizung des sensomotorischen Cortex Aktionspotentiale synaptisch ausgelöst, wie in A dargestellt ist. Unter Gabe von HA-966 wird das EPSP reduziert und daher die Erregungsschwelle des Aktionspotentials teilweise nicht mehr erreicht. Die Amplitude des

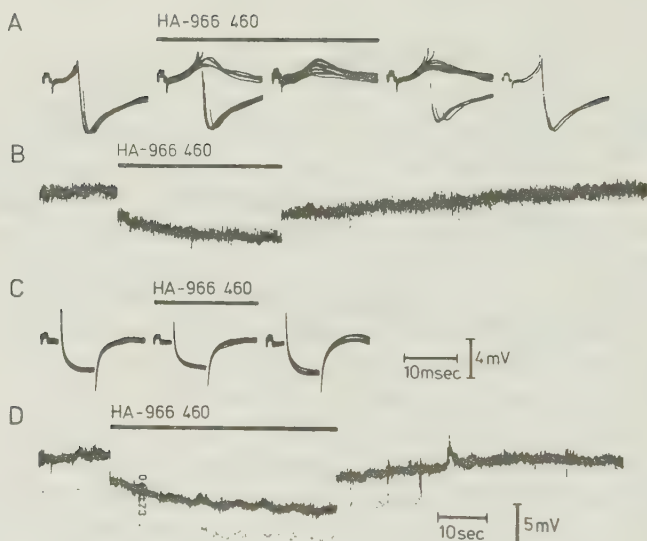


Abb. 16: Eigenwirkung von HA-966 auf synaptische Potentiale, das Membranpotential und die Membranleitfähigkeit eines rubrospinalen Neurons

- A: Durch Reizung des sensomotorischen Cortex (150 mV für 0,1 ms) ausgelöste Aktionspotentiale und EPSPs, nur die Nachhyperpolarisation der Aktionspotentiale ist abgebildet. 5-10 Strahldurchläufe wurden übereinanderphotographiert. Die Abbildungen wurden zur gleichen Zeit wie das in B dargestellte Membranpotential gewonnen. Kalibrierung wie in C (Kalibrierungspuls: 1 mV für 1 ms).
- B: Membranpotentialregistrierung (Ruhepotential: - 63 mV). Deutlich zu unterscheiden von den Schaltartefakten des HA-966-Phoresesstromes ist die langsame Hyperpolarisation der Membran. Kalibrierung wie in D.
- C: Selbe Zelle wie in A und B. Mit negativen Strompulsen von -1 nA (Dauer 8 ms) wird ein elektrotonisches Potential hervorgerufen, das sich unter Einwirkung von HA-966 reduziert. Mehrere Strahldurchgänge sind übereinanderphotographiert. Die Abbildungen wurden zur gleichen Zeit wie die Registrierung in D gewonnen.
- D: Membranpotentialableitung (Ruhepotential : -62 mV). Die Amplitude der elektrotonischen Potentiale (C) erscheint als dünne Linie unterhalb des Membranpotentials.

EPSPs beträgt 2,5 mV. Im Plateau der Hyperpolarisation durch HA-966 ist das EPSP am stärksten vermindert (1-2 mV). 10 s nach Abschalten von HA-966 erreicht das EPSP seine anfängliche Größe, vereinzelt wird die Entladungsschwelle wieder erreicht. Am Ende der Repolarisation des Membranpotentials in B folgt jedem Reiz wieder ein Aktionspotential.

Die Hyperpolarisation dieser Zelle durch HA-966 war von einer Leitfähigkeitszunahme der Membran begleitet. In D ist die Registrierung des Membranpotentials gezeigt, HA-966 hyperpolarisiert das Neuron langsam um 3,5 mV. Zur selben Zeit wurde der Membranwiderstand mit Strompulsen von -1 nA (8 ms) gemessen, wie in C dargestellt ist. Der Widerstand der Membran beträgt im Kontrollwert 2,5 M Ω , unter HA-966 verringert er sich auf 2,2 M Ω , die anschließende Kontrolle erreicht den Ausgangswert. Ein Cl⁻-Strom von 460 nA hatte keinen Einfluß auf das Membranpotential, das synaptisch ausgelöste Aktionspotential und die Leitfähigkeit der Membran (nicht illustriert).

HA-966 wurde an 14 Neuronen als Kation appliziert; an 11 Zellen hatte es eine hyperpolarisierende Wirkung, an 2 ging die anfängliche Hyperpolarisation in eine länger anhaltende Depolarisation über, an einem Neuron hatte es keinen Effekt auf das Membranpotential. An 10 rubrospinalen Zellen wurde es als Anion freigesetzt; 7 wurden hyperpolarisiert, 2 geringfügig depolarisiert, an einem konnte keine Wirkung gesehen werden. Durch Reizung des N. interpositus ausgelöste EPSPs wurden von HA-966 bei 7 Zellen verkleinert, an einer Zelle zu 55 %. Bei 2 Zellen blieb das EPSP unverändert. Bei 3 Neuronen wurde die Amplitude corticaler EPSPs verringert. An 6 Neuronen waren unter dieser Substanz zusätzlich zu einer Hyperpolarisation Leitfähigkeitszunahmen zu sehen, an einem wurde das elektrotonische Potential vergrößert.

4. DISKUSSION

Die Technik der Mikroiontophorese gestattet, geladene Substanzen mittels Stromfluß in unmittelbarer Nähe des Ableitungsortes freizusetzen. Sie brachte damit eine Möglichkeit, auch im ZNS des Säugetieres Untersuchungen über Art und Natur der chemischen, synaptischen Übertragung an der Nervenmembran anzustellen.

4.1. Methodische Aspekte

Aus in-vitro Untersuchungen mit radioaktiv markierten Transportkandidaten ergab sich, daß direkt proportional zur Phoresestromstärke die freigesetzte Menge und damit die extrazelluläre Konzentration einer Substanz anwachsen (Krnjević und Phillis 1963, Ziegelgänsberger et al. 1969, Obata et al. 1969, Hoffer et al. 1971). Iontophoresestrom und freigesetzte Substanzmenge stehen nach dem Faraday'schen Gesetz über die Transportzahl $t = z n F / Q T$ in Verbindung (t = Transportzahl, z = Wertigkeit, n = Betrag der freigesetzten Substanz (Mol), F = Faraday'sche Konstante, Q = gesamter Ionenstrom (Coulomb), T = Freisetzungszeit). Die Transportzahl gibt das Verhältnis der auf die Substanz entfallenden Strommenge zur Gesamtstrommenge an. Wie aus den Abb. 3, 4 und 7 bei extra- und intrazellulärer Ableitung gesehen werden kann, verstärkt sich erwartungsgemäß mit steigender Phoresestromstärke die Wirkung der Aminosäuren auf die untersuchten Neurone.

Ein Vergleich der Wirkstärke zweier Substanzen an Hand gleichgroßer Iontophoreseströme (s. 4.6.) wird allerdings dadurch erschwert, daß trotz gleichen pH-Wertes und gleicher Molarität der Substratlösungen die Transportzahlen zweier Mikrokapillaren bei gleichem elektrischem Widerstand unterschiedlich sein können. Auch konnte gezeigt werden, daß die Transportzahl sich bei Vergrößerung der Spitzendurchmesser trotz Widerstands-

abnahme der Elektrode nicht erhöhen muß. Kristallisationen an der Kapillaröffnung können wie eine semipermeable Membran den Durchtritt größerer Moleküle verhindern, ohne die Stromstärke zu beeinflussen, da kleine Ladungsträger wie Na^+ - oder Cl^- -Ionen passieren können (Krnjević und Phillis 1963). Dieser Sachverhalt könnte der Unwirksamkeit der Aminosäuren und der anderen verwendeten Substanzen an einigen Zellen zu Grunde liegen.

Daß ein systematischer Fehler in der Applikationsweise die unterschiedlich erregenden Wirkungen der Aminosäuren (s. 3.1. und 3.2.1.) bedingt, ist jedoch unwahrscheinlich. Auch bei Herabsetzung der Molarität der DL-H-Lösungen war diese Aminosäure deutlich stärker wirksam als aus hochmolaren Lösungen freigesetztes Glut und Asp. Die auch an anderen zentralen Neuronen mit Iontophorese- und Bad Applikationstechnik nachgewiesene deutlich stärkere Wirkung von DL-H (Curtis und Johnston 1974; Sonnhof et al. 1974) scheint durch biologische Mechanismen bedingt zu sein (s. 4.6.).

Um die Substanzen durch ionalen Stromfluß freisetzen zu können, wurden sie mit NaOH- oder HCl-Lösungen auf einen pH-Wert eingestellt, bei dem sie zum größeren Teil in positiv bzw. negativ geladener Form vorliegen (s. 2.7.). HA-966 konnte bei unterschiedlichen pH-Werten sowohl anionisch als auch kationisch geladen und freigesetzt werden, die Wirkung auf die untersuchten Neurone war gleichartig, auch wenn hohe Phoresestromstärken verwendet wurden. Eine Abhängigkeit von sauer oder basisch angesetzter Lösung konnte somit nicht gesehen werden.

Die Methode der Mikroiontophorese macht es notwendig, einen Eigeneffekt des positiven oder negativen Freisetzungsstromes von der Wirkung der Substanzen an der Zellmembran trennen zu können. Die enge räumliche Beziehung zwischen Ableitelektrode und Iontophoresekapillaren (s. 2.6.), und der Umstand, daß die Referenzpunkte der Ableitelektrode und der Phoressekapillaren identisch sind (Gewebe des Versuchstieres), führen zu elektrischen Kopplungsartefakten bei Iontophoresestromgabe. Wie

bei intrazellulärer Ableitung (s. Abb. 7A) gesehen werden kann, ist das Anschalten des negativen Asp-Phoresestromes von einer sprunghaften Auslenkung des Membranpotentials in negativer Richtung begleitet, die mit der Phoresestromstärke anwächst. Auffällig ist, daß der Betrag des Einschaltartefaktes bei allen Stromstärken kleiner ist als der des umgekehrten Ausschaltartefaktes (s. auch Abb. 5, 6C, 8A und B, 15B). Eine Erklärung dieses Phänomens kann darin gesehen werden, daß der Kopplungswiderstand zwischen Ableitelektrode und Phoresekapillaren, in den der Membranwiderstand mit eingeht, sich unter dem Einfluß der Aminosäuren verringert (Widerstandsabnahme der Membran), der negative Strom also die Ableitelektrode (Ziegelgänsberger und Puil 1973 a) und wohl auch die Membran zunehmend negativ polarisieren kann, da einige Neurone erst nach Ausschalten des Aminosäuren-Phoresestromes spontan entluden, die Schwelle des Aktionspotentials somit erst nach der sprunghaften Abnahme des Membranpotentials erreicht wurde. Der Betrag der Depolarisation wäre dann eigentlich größer und würde eher mit der Amplitude der Repolarisation übereinstimmen (s. Abb. 6C). Eine nähere Analyse der Änderungen des Kopplungswiderstandes kann allerdings unter den Versuchsbedingungen nicht gegeben werden.

Bei einigen Untersuchungen war der elektrische Artefakt bei Einschalten des Stromes sogar größer als bei Ausschalten (s. Abb. 10 B). Es ist denkbar, daß die extrazelluläre Freisetzung negativer Ladungen zu einer Verringerung des Membranpotentials führen kann. Die Nähe der Phoresekapillaren zur Zellmembran wird dabei von Bedeutung sein. Während der in Abb. 10 dargestellten Messung lagen die Öffnungen der Phoreselektrode vermutlich nahe an der Zellmembran, da später durch einen kleinen Elektrodenschritt ($6\ \mu$) die gesamte Mehrfachelektrode intrazellulär zu liegen kam. Die geringfügige Depolarisation durch den Kontrollstrom in Abb. 10 B könnte so erklärbar sein. Sie ist allerdings deutlich unterschieden von der Wirkung der Aminosäuren Glut und Asp, die beide das Membranpotential beträchtlich verringern.

Bei extrazellulärer Ableitung der Entladungsfrequenz (s. Abb. 4) zeigten Cl^- -Ionenströme bei höheren Stromstärken an einigen Neuronen eine deutlich erregende Wirkung, Na^+ -Ionenströme verringerten z.T. sehr wirksam die Entladungsrate von rubro-spinalen Zellen (s. Abb. 12). Abhängig von der Lage der Elektroden zur Membran des Neurons könnten auch hier Cl^- -Ionen im Sinne eines Katelektrotonus erregend wirken, während Na^+ -Ionen dann anelektrotonisch die Erregbarkeit herabsetzen würden. Die Wirkung der Cl^- -Kontrollströme war jedoch in allen Fällen geringer als die der Aminosäuren (s. 3.1. und 3.2.1.), beim Großteil der untersuchten Neurone ließen die Kontrollen eine wesentliche Beteiligung des Freisetzungstromes an der Aminosäurewirkung ausschließen.

Die untersuchten Neurone entluden selten spontan, die Frequenz überstieg nicht 30 Imp/s. Zur extrazellulären Untersuchung von HA-966 und GDEE wurden sie daher durch die Aminosäuren zur Entladung von Aktionspotentialen angeregt. Die positiven Freisetzungströme von HA-966 (bei pH 5,5) und GDEE, ebenso ein Na^+ -Kontrollstrom können aber die Ausbreitung der negativ geladenen Aminosäuren behindern, da ein Teil der Anionen in die positive Kapillare fließen kann (Ziegelgänsberger und Puil 1973 a). Kontaminierung der NaCl-Kapillaren wird aber nur teilweise die hemmende Wirkung der Na^+ -Ströme und die Erregung durch Cl^- -Kontrollströme erklären können, da Na^+ -Ströme bei einigen Zellen die Spontanaktivität sogar wirksamer unterdrückten als vergleichbare HA-966 oder GDEE-Phoreseströme. Die extrazellulären Messungen an 18 Neuronen lassen in den vorliegenden Untersuchungen keine einheitliche Aussage über die Wirkstärke der hemmenden Substanzen zu.

Mit den zu intrazellulärer Ableitung verwendeten Glaskapillaren von im Mittel $1,2 \mu\text{m}$ Spitzendurchmesser konnte wahrscheinlich nur aus dem Zellsoma oder den breiten Hauptästen der Dendriten abgeleitet werden (Curtis et al. 1972). Bei einem Spitzenabstand der Mehrfachelektroden von 50-80 μm erfolgte

dann die Freisetzung der Substanzen vermutlich näher am Soma als in den langen Dendriten der rubrospinalen Neurone (Conde und Conde 1973). Auch bei extrazellulärer Ableitung von Aktionspotentialen muß die Ableitelektrode in Soma-Nähe gelegen haben, um bei dem hohen Widerstand der feinen Kapillaren (s. 2.6.) ein ausreichendes Signal/Rausch Verhältnis zu erhalten. Die Öffnungen der Iontophoresekapillaren lag daher wohl auch näher am Zellsoma als in den dendritischen Endaufzweigungen. Die Ausbreitung einer mikroiontophoretisch freigesetzten Substanz im Nervengewebe erfolgt hauptsächlich durch Diffusion (Herz et al. 1969). Die größte Entfernung, in der unter Verwendung der Mikroiontophoresetechnik eine erregende Wirkung von Glut an corticalen Neuronen nachgewiesen werden konnte, war 300 μm (Herz et al. 1969). Intrazelluläre Aufnahme und enzymatischer Abbau durch Nervenzellen sowie Diffusionsbarrieren (z.B. Gliazellen) werden als limitierender Prozeß angegeben. Zu entfernteren Zellteilen wird daher bei der Applikation aus einer punktförmigen Quelle sicher ein Konzentrationsgradient auftreten, der die Aussagefähigkeit einer Dosis-Wirkungsbeziehung einschränkt (Curtis 1971, s. 4.4.).

4.2. Wirkort der Aminosäuren

Eine Voraussetzung der erregenden Wirkung der Aminosäuren scheint zu sein, daß an der Zellmembran exzitatorische Synapsen vorhanden sind (Curtis et al. 1972, Curtis und Johnston 1974), da weder Gliazellen (Krnjević und Schwartz 1967) noch die Ganglienzellen der Hinterwurzeln, die frei von Synapsen sind, durch die Aminosäuren erregt werden (Nishi et al. 1965). An Pyramidenzellen des Hippocampus von Meerschweinchen (Schwartzkroin und Andersen 1974) hat iontophoretisch freigesetztes Glut die stärkste erregende Wirkung in circumscrip-ten (10-15 μm) dendritischen Regionen, in denen exzitatorische Bahnen Synapsen bilden. Da an rubrospinalen Neuronen erregende Bahnen sowohl am Soma und somanahen Dendriten, als auch in den Aufzweigungen der Dendriten endigen (s. 1.2.), ist eine exzitatorische Wirkung der Aminosäuren an der gesamten soma-

dendritischen Membran anzunehmen.

4.3. Postsynaptische Wirkung der Aminosäuren

Um zu beweisen, daß die im N. ruber vorkommenden Aminosäuren Glut und Asp eine Funktion als physiologische Transmitter haben, wäre es wichtig zu zeigen, daß die Auslösung der depolarisierenden Wirkung tatsächlich direkt an der postsynaptischen Membran erfolgt, ohne daß indirekt über einen Einfluß auf Interneurone oder exzitatorische Fasern der physiologische exzitatorische Transmitter freigesetzt wird.

Die vom N. interpositus und vom sensomotorischen Cortex zum N. ruber ziehenden exzitatorischen Bahnen sind monosynaptisch verschaltet. Hinweise auf Interneurone im Kerngebiet, die in die erregenden Bahnen zwischengeschaltet wären, gibt es nicht (Massion 1967, Toyama et al. 1968, Tsukahara et al. 1968, Davis 1969, Toyama et al. 1970). Eine exzitatorische Wirkung der Aminosäuren an rubrospinalen Zellen durch Einwirkung auf Interneurone und eine daraus resultierende Freisetzung des physiologischen Transmitters ist nach dem heutigen Wissen unwahrscheinlich.

Eine Erhöhung der Entladungsfrequenz afferenter Fasern führt zu vermehrter Freisetzung des physiologischen Transmitters. Untersuchungen an Fasern durch andere Autoren (Curtis et al. 1960, Curtis 1965) und eigene intracelluläre Ableitungen aus Fasern des Rubrospinal-Traktes und der interposito-rubralen Bahnen zeigten, daß mit Iontophoresetechnik applizierte Aminosäuren keine Wirkung an der conductilen Fasermembran haben. Eine Beteiligung der präsynaptischen Terminalen an der Aminosäuren-Depolarisation konnte bisher allerdings bei keinem höheren Organismus sicher ausgeschlossen werden (Werman 1966, Curtis et al. 1970). Alle meßbaren postsynaptischen Effekte, Depolarisation, Leitfähigkeitsänderung, Verkleinerung synaptischer Potentiale, wären durch direkten Angriff der Aminosäuren an der präsynaptischen Terminale und möglicher Freisetzung des physiologischen Transmitters erklärbar (Salmoi-

raghi und Stefanis 1967). Nach Untersuchungen an der mit Mikroelektroden zugänglichen präsynaptischen Terminale des Tintenfisch-Riesenaxons (Takeuchi, A. und N. Takeuchi 1962) ist die freigesetzte Transmittermenge abhängig von der Aktionspotential-Höhe an der präsynaptischen Membran. Depolarisation verringert die Amplitude des Aktionspotentials und somit die Transmittermenge. Glut und DL-H erhöhen die Erregbarkeit der primären Ia-Afferenzen des Katzenrückemarks, vermutlich über eine Depolarisation der synaptischen Terminalen (Curtis und Ryall 1966). Daß dadurch präsynaptische Aktionspotentiale ausgelöst werden können, die zu einer Freisetzung des physiologischen Transmitters führen, ist nicht auszuschließen.

Sonnhoff et al. (1974) wiesen jedoch an Motoneuronen des Frosches bei Anwendung der Bad-Diffusionstechnik eindeutig nach, daß Glut und Asp direkt die postsynaptische Membran depolarisieren, nachdem durch Erhöhung der extracellulären Magnesium-Konzentration die Freisetzung der physiologischen Überträgerstoffe ausgeschaltet werden konnte (del Castillo und Engbaek 1954).

Auch unter Einwirkung von Tetrodotoxin, das den schnellen Na^+ -Einstrom und damit die Aktionspotentialauslösung an Nerven- und Fasermembranen blockiert, war die depolarisierende Wirkung von Glut und DL-H an Motoneuronen der Katze unverändert (Curtis 1972). Eine Transmitterfreisetzung aus den synaptischen Terminalen durch Aktionspotential-Generierung konnte so ausgeschlossen werden. Es ist somit eher anzunehmen, daß auch an rubrospinalen Neuronen die meßbare postsynaptische Wirkung der Aminosäuren tatsächlich direkt an der Membran ausgelöst wurde.

Die Aminosäuren Glut, Asp und DL-H depolarisierten reversibel rubrospinale Neurone, die Wirkung war von einer Leitfähigkeitszunahme der Membran begleitet. Verglichen zu Motoneuronen der Katze (Ziegelgänsberger und Puil 1973 a) ist die

Abnahme des Membranwiderstandes jedoch eher gering. An Motoneuronen des Frosches war sogar trotz stark depolarisierender Wirkung der Aminosäuren am Soma keine Leitfähigkeitszunahme nachweisbar, mikroiontophoretische Untersuchungen ergaben, daß die erregende Wirkung vermutlich ausschließlich durch die Depolarisation der Dendritenmembran hervorgerufen wird (Sonnhof et al. 1974).

Eine klare Unterscheidung, ob die Depolarisation der rubrospinalen Neurone hauptsächlich an der Dendritenmembran mit elektrotonischer Ausbreitung in das Zellsoma erfolgte, oder eher an somatischen Membranteilen, kann nicht getroffen werden. Die am Ort der Ableitung, dem Zellsoma meßbare Leitfähigkeitszunahme unter Einwirkung der Aminosäuren, macht es wahrscheinlich, daß zumindest ein Teil der Rezeptoren am Soma und proximalen Dendriten liegen. Unter Einwirkung der hemmenden Aminosäure GABA, die vermutlich an inhibitorischen Synapsen wirkt (Krnjević et al. 1974) war eine konstant stärkere Leitfähigkeitszunahme rubrospinaler Neurone zu sehen (Altmann et al. 1973) als unter Glut, Asp und DL-H. Ein Grund dafür könnte sein, daß GABA hauptsächlich am Zellsoma wirkt, an dem die inhibitorischen Afferenzen endigen (Tsukahara und Fuller 1969). Die, verglichen zur eher geringen Leitfähigkeitszunahme, starke depolarisierende Wirkung der Aminosäuren läßt vermuten, daß dendritische Membranteile wesentlich an der erregenden Wirkung beteiligt sind.

Die sich aus Abb. 9B ergebende Zeitkonstante τ_M der Membran ist in guter Übereinstimmung mit Zeitkonstanten von Motoneuronen (s. Richter et al. 1974), sie liegt innerhalb der für rubrospinale Zellen angegebenen Werte (Toyama et al. 1968). Die Verringerung der Zeitkonstante unter Einwirkung von Glut und Asp ist wahrscheinlich nur der Widerstandsabnahme der Membran zuzurechnen, da auch während der Erregung die Kapazität der Membran gleich bleibt (Cole und Curtis 1939, S. Katz 1936). In den ersten 3 ms fällt das elektrotonische

Potential steiler ab, auch unter Glut und Asp verändert sich der schnelle Anteil nicht. Er wird vermutlich durch einen Ausgleichstrom in benachbarte Zellteile bestimmt (Rall 1960, Richter et al. 1974).

Während der von den Aminosäuren hergerufenen Depolarisationen verringerten sich die Amplituden der cerebellären und corticalen EPSPs. (Abb. 10 A, 15 A). Inwieweit diese Wirkung allein von der Amplitude der Depolarisation bestimmt wird, oder die Leitfähigkeitszunahme der Membran eine zusätzliche Reduktion bewirkt, konnte wegen der experimentellen Schwierigkeiten bei intrazellulärer Stromgabe nicht exakt unterschieden werden. Auch eine Verkleinerung der EPSPs durch Depolarisation der präsynaptischen Terminalen kann nicht ausgeschlossen werden.

Bei dem Großteil der untersuchten Neurone wurden mit dem Überschreiten der Erregungsschwelle durch die Aminosäuren-Depolarisationen frequente Entladungen der Zellmembran hervorgerufen. Wie aus der Abb. 6 hervorgeht, nimmt mit anwachsender Depolarisation die Entladungsfrequenz bis zu einem Sättigungswert zu. Aus der Abhängigkeit der Depolarisation (Abb. 7) wie auch der extrazellulär gemessenen Entladungsfrequenz der Zellen (Abb. 3 und 4) von der Iontophoresestromstärke kann geschlossen werden, daß die Frequenz der Aktionspotentiale von der Höhe des Membranpotentials bestimmt wird. Das ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen an Motoneuronen, bei denen intrazelluläre positive Strompulse mit ansteigender Depolarisation eine Zunahme der Entladungsfrequenz bewirkten (Granit et al. 1963, Kernell 1965, Richter et al. 1974). Das plötzliche Aufhören der spontanen Entladungen in Abb. 6 könnte durch die Inaktivierung des Na^+ -Systems bedingt sein, die Zelle befindet sich im Depolarisationsblock (Curtis et al. 1960, Crawford und Curtis 1964). Daß durch Reizung des N. interpositus noch synaptisch ein Aktionspotential ausgelöst werden konnte, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß nicht die gesamte Zellmembran von Asp gleichförmig de-

polarisiert war, da mit iontophoretischer Freisetzung vermutlich nicht alle Membranrezeptoren erreicht werden konnten.

Die depolarisierende Wirkung der Aminosäuren wird durch eine Leitfähigkeitzunahme der Membran für Na^+ -Ionen verursacht, die zu einem Einstrom dieser Ionen entlang ihrem elektrochemischen Gradienten führt (Bernardi et al. 1972, Krnjevic und Schwartz 1967, Ziegelgänsberger und Puil 1973 a). Daß die rubrospinalen Neurone unter der depolarisierenden Wirkung der Aminosäuren wahrscheinlich vermehrt Na^+ -Ionen intrazellulär aufnahmen, könnte aus den langdauernden Hyperpolarisationen der Membran nach Beendigung der Aminosäurenfreisetzung angenommen werden (s. Abb. 6 C und 7 A). Koike und Mitarbeiter (1972) zeigten an Zellen des Pyramidentraktes, daß intrazelluläre Applikation von Na^+ -Ionen zu einer mehrere Minuten dauernden Hyperpolarisation der Zellen führt, die mit der Menge der intrazellulären Na^+ -Ionen zunimmt. Ein zumindest teilweise elektrogener Auswärts-Pumpmechanismus für Na^+ -Ionen könnte die Erhöhung über das Ruhemembranpotential hinaus erklären (Thomas 1972). Daß die Nachhyperpolarisationen unabhängig von Aktionspotentialen auftraten, die zu einem vermehrten Einstrom von Na^+ -Ionen führen, kann aus der Membranpotentialregistrierung der Abb. 7 A gesehen werden.

4.4. Dosis-Wirkungsbeziehung

Die exzitatorische Wirkung der Aminosäuren war abhängig von der Iontophoresestromstärke und damit von der extrazellulären Konzentration. Der Verlauf der Kurven in Abb. 3B und 7B ist sigmeförmig, was in einer Dosis-Wirkungsbeziehung zu erwarten ist. Die Technik der Mikroiontophorese läßt allerdings einen Vergleich mit üblichen Substanz-Rezeptor-Interaktionen nicht uneingeschränkt zu (Curtis 1969), bei denen eine definierte Menge von Rezeptoren einer gleichförmigen Konzentration der Substanz in der Extrazellulärflüssigkeit gegenübersteht, wie es z.B. bei der Untersuchung isolierter Gewebestücke oder Organe mit der Bad-Diffusionstechnik der Fall ist. Die Appli-

kationsweise aus einer punktförmigen Quelle beinhaltet von vornherein einen Konzentrationsgradienten zu entfernteren Zellteilen.

Wie in Abb. 7 A gezeigt wird, nahmen abhängig von der Asp-Phoresestromstärke die Amplitude und die Steilheit der Depolarisation zu, die Latenz des Wirkungseintritts jedoch ab. Unter der Einwirkung der Aminosäure wurde jeweils ein Sättigungswert der Depolarisation erreicht, der bis zur Beendigung der Freisetzung annähernd konstant blieb. Während nahe am Freisetzungsort gelegene Membranrezeptoren bereits abgesättigt sein können, wird an entfernteren Rezeptoren erst unter höheren Phoresestromstärken eine ausreichende Wirkkonzentration erreicht werden (Curtis et al. 1972). Somit werden die Sättigungswerte durch ein Gleichgewicht zwischen Diffusion der Aminosäuren und den die Ausbreitung begrenzenden Prozessen bestimmt: Intrazelluläre Aufnahme der Aminosäuren Glut und Asp durch das Nervengewebe wurde nachgewiesen (s. 1.1.), vermutlich ist auch die Neuroglia an Aufnahme und Abbau der Aminosäuren beteiligt (Henn und Hamberger 1971, Curtis und Johnston 1974). Im N. ruber ist die Glia stark ausgebildet (Tredici et al. 1973), einzelne Membranabschnitte sind offensichtlich durch lamelläre Fortsätze voneinander getrennt, diese könnten für die Aminosäuren eine erhebliche Diffusionsbarriere darstellen. (Curtis et al. 1966). Die begrenzte Ausbreitung iontophoretisch freigesetzter Aminosäuren (s. 4.1.) macht es daher unwahrscheinlich, daß an den großen rubrophi-nalen Neuronen auch mit hohen Freisetzungsströmen alle Rezeptoren von den Aminosäuren in ausreichender Konzentration erreicht werden können.

4.5. Gleichgewichtspotential der Aminosäuren-Depolarisation

Die Amplituden der Aminosäuren-Depolarisation sind abhängig vom Ausgangswert des Membranpotentials (Abb. 8). Die Regressionsgerade der Asp-Wirkung in der Abb. 8 C schneidet unter der Voraussetzung einer linearen Zunahme der Strom-Spannungsbeziehung die Abszisse bei + 6,7 nA. Nach dem Ohm'schen Gesetz

errechnet sich das Umkehrpotential für ein Membranpotential von ca. -30 mV.

Dieser Wert entspricht den maximalen Depolarisationen, die unter Verwendung hoher Phoreseströme der Aminosäuren an einigen rubrospinalen Neuronen erreicht werden konnten (s. Abb. 3C). Untersuchungen an spinalen Motoneuronen der Katze ergaben vergleichbare Werte (Curtis 1965, Ziegelgänsberger und Puil 1973a): Mit hohen Iontophoreseströmen (bis 2000 nA) freigesetztes Glut depolarisierte die Zellmembran bis etwa - 30 mV. Bei Stromgabe in das Zellsoma war die depolarisierende Wirkung bei einem Membranpotential von ca. -30 mV aufgehoben, bei niedrigeren Membranpotentialwerten drehte sie sich in eine hyperpolarisierende Wirkung um.

Auf Grund der dargelegten experimentellen Bedingungen ist allerdings nicht anzunehmen, daß dieser Potentialwert von etwa -30 mV dem tatsächlichen Gleichgewichtspotential der Aminosäuren-Depolarisationen entspricht. Da wahrscheinlich nur Soma-nahe Rezeptoren abgesättigt sind, würde der Einstrom positiver Ionen an diesen Membranabschnitten dann zu einem Strom positiver Ladungsträger in die elektronegativeren Dendriten führen, der der Depolarisation entgegen wirkt. Auch werden bei den, verglichen zum EPSP, langdauernden Einwirkungen der Aminosäuren soviel Na^+ -Ionen intrazellulär aufgenommen, daß die Aktivierung der elektrogenen Na^+ -Pumpe vermutlich bereits zu einer Erhöhung des Membranpotentials führt.

Das Gleichgewichtspotential des EPSP's wird bei Membranpotentialwerten von -20 bis 0 mV angegeben (Coombs et al. 1955, Eccles 1964, Toyama 1968). Die Diskrepanz zwischen den Umkehrpotentialen der Aminosäuren-Depolarisationen und der EPSPs war ein gewichtiges Argument gegen eine mögliche Transmitterfunktion von Glut und Asp (Curtis et al. 1965). Dieser Widerspruch wurde von Smith und Mitarbeitern (1967) abgeschwächt, die an Motoneuronen der Katze zeigten, daß eine Umkehr des EPSP's durch Stromgabe in das Zellsoma nicht zu erreichen war, da die Dendritenmembran, an der exzitatori-

sche Bahnen hauptsächlich endigen, weniger polarisiert werden kann als das Zellsoma. Um die Wirkung der Aminosäuren in der Nähe des Zellsomas aufzuheben, wäre dann weniger Strom erforderlich, als zur Umkehr des EPSPs notwendig ist; das Umkehrpotential der Aminosäuren-Depolarisationen liegt somit vermutlich nur scheinbar beträchtlich unter dem des EPSP's.

Daß die technischen Voraussetzungen der Mikroiontophorese vermutlich eine exakte Bestimmung der Gleichgewichtspotentiale der Aminosäuren-Depolarisationen nicht zulassen, könnten aus Untersuchungen an Frosch-Motoneuronen unter Anwendung der Bad-Diffusionstechnik geschlossen werden (Sonnhof et al. 1974). Mit Konzentrationen von Asp und Glut von 5×10^{-3} mMol in der Badlösung wurden Depolarisations-Amplituden von 50 - 60 mV erreicht, was einem Membranpotential von -20 bis -10 mV entspricht. Dieser Wert kommt wahrscheinlich den Gleichgewichtspotentialen der EPSPs nahe.

4.6. Wirkstärkevergleich der Aminosäuren

Gemessen an gleichgroßen Iontophoreseströmen (Abb. 4,5) hatten die Aminosäuren unterschiedliche Wirkstärken. An allen Neuronen, an denen Glut und Asp verglichen werden konnten, ließ sich eine geringfügige stärkere Wirkpotenz von Asp feststellen, wenn man den Betrag der Depolarisation (Abb. 5,8,10) und der Leitfähigkeitszunahme (Abb. 9), oder die Erhöhung der Entladungsfrequenz (Abb. 4) zu Grunde legt. Die Zeitgänge von Depolarisationseintritt und Repolarisation nach Abschalten des Phoresestromes sind an Neuronen des N. ruber für beide Aminosäuren vergleichbar, das gilt auch für andere zentrale Neurone (Curtis 1969).

Die enge metabolische Beziehung beider Aminosäuren im Nervengewebe (s. 1.1.) und die vergleichbare erregende Wirkung könnten die Annahme unterstützen, daß die die Erregung der Nervenmembran auslösenden Rezeptoren und die inaktivierenden Mecha-

nismen für beide Aminosäuren identisch sind. Die in den vorliegenden Untersuchungen festgestellte geringfügig stärkere Wirkung von Asp könnte aus der um eine CH_3 -Gruppe kleineren Molekülgröße resultieren: die Diffusionskonstante von Asparagin ist um nahezu 10 % größer als die von Glutamin (Longsworth 1953). Es könnte lokal eine höhere Konzentration von Asp erreicht werden und damit eine größere Anzahl von Rezeptoren beteiligt sein.

Verglichen zu den im Nervengewebe vorkommenden Aminosäuren hatte DL-H an allen untersuchten Neuronen eine wesentlich stärkere Wirkung (Abb. 4 und 5). Der Zeitgang der Repolarisation nach Abschalten des Phoresestromes war deutlich langsamer als der von Glut oder Asp (s. Abb. 5 B, 14 und 15 B). Bei Messung antidromer und synaptischer Feldpotentiale (Abb. 13) wurde häufig die Kontrollgröße nach DL-H-Applikation erst nach mehreren Minuten wieder erreicht. Diese auch an anderen Neuronen stark exzitatorisch wirkende Aminosäure (Curtis und Watkins 1960) konnte bisher nicht aus Nervengewebe isoliert werden (Curtis 1965); es ist wahrscheinlich, daß DL-H weder enzymatisch inaktiviert noch intracellulär aufgenommen werden kann (Balcar und Johnston 1972 a). Das könnte die deutlich stärkere und längere Wirkung erklären, da die Konzentration an der Membran höher sein wird als die der natürlich vorkommenden Aminosäuren, auch wird die ungehinderte Diffusion entferntere Rezeptoren leichter erreichen (Curtis et al. 1972). Ob die für die Excitation durch DL-H verantwortlichen Rezeptoren mit denen der physiologischen Aminosäuren identisch sind, konnte bisher nicht geklärt werden.

4.7. GDEE und HA-966

Intrazelluläre Ableitungen zeigten einen Eingeneffekt von GDEE, der mit den Untersuchungen von Ziegelgänsberger und Puil (1973 b) übereinstimmt, die eine Glycin-ähnliche Wirkung der Substanz annehmen. Die an rubrospinalen Neuronen gesehene Hyperpolarisation war allerdings nicht von einer

Leitfähigkeitszunahme der Membran begleitet. Auf eine nähere Analyse des Wirkmechanismus von GDEE wurde verzichtet, da eine spezifische Hemmung von Glut (Haldeman und McLennan 1972) weder in extrazellulären (Abb. 13) noch in intrazellulären Messungen (Abb. 14) gesehen werden konnte. Die an dem Neuron der Abb. 14 gezeigte isolierte Hemmung der DL-H Wirkung könnte durch einen unterschiedlichen Rezeptor der Aminosäuren Glut und DL-H bedingt sein.

HA-966 hyperpolarisiert die Membran rubrospinaler Neurone (Abb. 16). Eine Einwirkung auf die interposito-rubralen Fasern mit einer Verminderung der tonischen Erregung (Tsukahara und Kosaka 1968) ist unwahrscheinlich, da die Leitfähigkeit der postsynaptischen Membran zunimmt, bei Disfazilitation müßte sie jedoch abnehmen. Die Eigenwirkung von HA-966 ist nicht unerheblich, die Wirkstärke entspricht etwa derjenigen von Glycin an rubrospinalen Zellen (Altmann et al. 1973). Daß HA-966 nicht an den Rezeptoren der inhibitorischen Aminosäuren angreift, kann angenommen werden. An Neuronen der Großhirnrinde und des N. cuneatus der Katze wurden die hemmenden Wirkungen von GABA und Glycin auf die Glut-Erregung durch Bicucullin und Strychnin aufgehoben, nicht jedoch der hemmende Effekt von HA-966 (Davies und Watkins 1973). Eine Selektivität der Hemmung der Aminosäuren Glut und Asp gegenüber der Acetylcholin-Erregung scheint an corticalen Neuronen (Davies und Watkins 1973) und Renshaw-Zellen (Curtis et al. 1973) gegeben zu sein. Gegenüber DL-H konnte an diesen Rückenmarksneuronen, wie in den vorliegenden Untersuchungen an rubrospinalen Zellen, allerdings keine unterschiedliche Wirkung gesehen werden.

HA-966 hemmt die depolarisierende Wirkung der Aminosäuren in vergleichbarem Ausmaß. Strukturähnlichkeiten mit den α -Aminosäuren lassen vermuten, daß die Aminosäurerezeptoren besetzt werden können (Davies und Watkins 1973). Inwieweit die Verkleinerung synaptischer Potentiale (Abb. 16 A) durch Hemmung des Rezeptors des physiologischen Transmitters oder

durch die Leitfähigkeitszunahme bedingt ist, konnte im einzelnen nicht unterschieden werden. Untersuchungen an Frosch-Motoneuronen (Sonnhof et al. 1974) lassen annehmen, daß die synaptische Übertragung durch HA-966 ausgeschaltet werden kann.

Es war die Absicht dieser Arbeit, eine mögliche Transmitterfunktion der im N. ruber der Katze vorkommenden Aminosäuren Glut und Asp mit der Methode der Mikroiontophorese zu bestätigen.

Einige elektrophysiologische Kriterien für einen excitatorischen Transmitter werden von beiden Aminosäuren erfüllt:

1. Rubrospinale Zellen werden stark depolarisiert, bei Überschreiten der Erregungsschwelle werden Aktionspotentiale ausgelöst.
2. Die Depolarisation ist von einer Leitfähigkeitszunahme der Membran begleitet, die vermutlich zu einem Na^+ -Einstrom führt.
3. Der schnelle Rückgang der Erregung nach Abschalten der Phoreseströme von Glut und Asp weist auf einen wirksamen Mechanismus der Inaktivierung hin, eine notwendige Voraussetzung neurochemischer Übertragung.
4. Unter Berücksichtigung der obigen Überlegungen könnte das Gleichgewichtspotential der Aminosäurendepolarisation und des EPSPs auf einem einheitlichen Potentialniveau liegen, ein gleichförmiger Ionenmechanismus ist damit denkbar.

Das Fehlen eines Blockers, der selektiv entweder die Glut-Erregung oder die Wirkung von Asp ausschaltet, verhinderte jedoch eine weitere exakte Bestimmung des excitatorischen Transmitters im N. ruber der Katze.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An rubrospinalen Neuronen von Katzen wurden die Aminosäuren Glutaminsäure (Glut), Asparaginsäure (Asp) und DL-Homocysteinsäure (DL-H), sowie die Substanzen 1-Hydroxy-3-amino-pyrrolidone-2 (HA-966) und Glutamat-Diäthylester (GDEE) iontophoretisch appliziert und ihre Wirkung bei extra und intrazellulärer Ableitung untersucht.

1. Bei extrazellulärer Messung der Entladungsfrequenz der Zellen zeigten alle untersuchten Aminosäuren eine von der Phoresestromstärke abhängige reversible erregende Wirkung. Mit ansteigenden Phoreseströmen nahm die Frequenz der Spontanentladungen zu; einige Zellen konnten zu Entladungen bis 300 Imp/s angeregt werden, eine weitere Erhöhung der Freisetzungsströme führte zum Depolarisationsblock. Gemessen an der Phoresestromstärke hatte DL-H die stärkste erregende Wirkung, auch Asp war an den meisten Zellen wirksamer als Glut.

2. Bei intrazellulärer Ableitung bewirkten die Aminosäuren eine reversible Depolarisation der Zellmembran; auch hier zeigte sich eine eindeutige Abhängigkeit der Wirkung von der Phoresestromstärke: Erhöhung der Freisetzungsströme vergrößerte die Amplituden der Depolarisationen.

Das Überschreiten der Schwelle des Aktionspotentials wurde von den meisten Neuronen mit frequenten Spontanentladungen beantwortet. Die Höhe des Aktionspotentials nahm mit zunehmender Depolarisation ab, bei einem Membranpotential von ca. -30 mV, das der maximalen erreichten Depolarisation bei einigen rubrospinalen Zellen entspricht, war die Auslösung spontaner Aktionspotentiale blockiert.

Die Amplitude der Depolarisationen war abhängig vom Ausgangswert des Membranpotentials: Erhöhung des Ruhepotentials durch intrazelluläre Stromgabe vergrößerte, Vordepolarisation der Zellmembran verringerte die Depolarisationsamplitude.

Durch Reizung des sensomotorischen Cortex und des cerebellären N. interpositus evozierte EPSPs verkleinerten sich während der durch die Aminosäuren hervorgerufenen Depolarisationen. Die unter der Einwirkung der Aminosäuren meßbare Leitfähigkeitszunahme der Membran läßt die Depolarisationen auf einen vermehrten Einstrom von Na^+ -Ionen zurückführen.

Verglichen zum Betrag der Freisetzungsströme hatte auch bei intrazellulärer Ableitung DL-H die stärkste Wirkung, Asp war geringfügig stärker wirksam als Glut. Der Zeitgang der Depolarisationen war für alle drei Aminosäuren vergleichbar. Während jedoch die Repolarisation nach Beendigung der Freisetzung der natürlich vorkommenden Aminosäuren Glut und Asp etwa gleich schnell erfolgte, war das Abklingen der Wirkung von DL-H bei den meisten Zellen deutlich langsamer.

3. Bei extrazellulärer Registrierung hemmten die Substanzen GDEE und HA-966 spontan und durch iontophoretisch freigesetzte Aminosäuren hervorgerufene Entladungen der Zellen. Die Wirkung war abhängig von der Phoresestromstärke; eine an der Stärke der Freisetzungsströme gemessene unterschiedliche Wirkstärke der beiden Substanzen konnte jedoch nicht gesehen werden.

4. GDEE zeigte bei intrazellulärer Ableitung eine geringe hyperpolarisierende Wirkung an den untersuchten Neuronen. Eine deutliche Hemmung der Aminosäure DL-H war zu sehen, wogegen die Wirkung von Glut nicht beeinflusst wurde. HA-966 verringerte die depolarisierende Wirkung aller drei Aminosäuren. Die Untersuchungen ergaben jedoch eine Eigenwirkung der Substanz an der Zellmembran: HA-966 hyperpolarisierte die Zellen und verkleinerte synaptische Potentiale, diese Wirkung war von einer Leitfähigkeitszunahme der Membran begleitet.

5. Die Aminosäuren Glut und Asp erfüllen weitgehend das Kriterium der Identität der Wirkung mit dem physiologischen exzitatorischen Transmitter. Die Eigenwirkung der Substanzen GDEE und HA-966 sowie ihre unspezifische Hemmung der erregen-

Wirkung aller drei Aminosäuren ließen einen Nachweis der pharmakologischen Identität der Aminosäuren Glut und Asp mit dem physiologischen exzitatorischen Überträgerstoff jedoch nicht zu.

Eine mögliche Funktion der Aminosäuren Glut und Asp als exzitatorische Transmitter im N. ruber der Katze wird eingehend diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Altmann, H., G. ten Bruggencate, U. Sonnhof und R. Steinberg: Action of γ -aminobutyric acid and glycine on red nucleus neurones. *Pflügers Arch.* 342, 283-288 (1973).
- Balcar, V.J. und G.A.R. Johnston: Glutamate uptake by brain slices and its relation to the depolarisation to neurones by amino acids. *J. Neurobiol.* 3, 295-301 (1972 a).
- Balcar, V.J. und G.A.R. Johnston: The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J. Neurochem.* 19, 2657-2666 (1972 b).
- Bernardi, G., W. Ziegelgänsberger, A. Herz und E.A. Puil: Intracellular studies on the action of L-glutamic acid on spinal neurones of the cat. *Brain Res.* 39, 523-525 (1972).
- Bonta, J.L., H. de Vos, F.G. Grijsen, H. Hillen, E.L. Noach und A.W. Sim: 1-Hydroxy-3-amino-pyrrolidone-2 (HA-966), a new GABA-like compound, with potential use in extrapyramidal diseases. *Br. J. Pharmacol.* 43, 514-535 (1971).
- Bradford, H.F.: Metabolic response of synaptosomes to electrical stimulation: release of amino acids. *Brain Res.* 19, 239-247 (1970).
- Brock, L.G., J.S. Coombs und J.C. Eccles: The recording of potentials from motoneurones with an intracellular electrode. *J. Physiol. London* 117, 431-460 (1952).
- Cannon, W.B. und Z.H. Baq: Studies on the conditions of activity in endocrine organs, XXVI. A hormone produced by sympathetic action on smooth muscle. *J. Physiol. London* 130, 392-412 (1931).
- del Castillo, J. und L. Engbaek: The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J. Physiol. London* 124, 370-384 (1954).
- Condé, F. und H. Condé: Etude de la morphologie des cellules du noyau rouge du chat par la methode de Golgi-Cox. *Brain Res.* 53, 249-271 (1973).

- Coombs, J.S., J.C. Eccles und P. Fatt: Excitatory synaptic action in motoneurones. *J. Physiol. London* 130, 374- 395 (1955).
- Crawford, J.M. und D.R. Curtis: The excitation and depression of mammalian cortical neurones by amino acids. *Brit. J. Pharmacol.* 23, 313-329 (1964).
- Curtis, D.R.: Microelectrophoresis. In: *Physical techniques in biological research*. Bd. 5, hsg. von W.L. Nastuk. Academic Press, New York, 144-190 (1964).
- Curtis, D.R.: The action of amino acids on mammalian neurones. *Studies in Physiol.* Springer, Berlin 34-42 (1965).
- Curtis, D.R.: Amino acid transmitters in the mammalian CNS. 4. Int. Congress on Pharm. 9-31, (1969).
- Curtis, D.R. und J.M Crawford: Central synaptic transmission-microelectrophoretic studies. *Annual Rev. of Pharm.* 9, 209-240 (1969).
- Curtis, D.R., A.W. Duggan, D. Felix, G.A.R. Johnston, A.K. Tebecis und J.C. Watkins: Excitation of mammalian central neurones by acidic amino acids. *Brain Res.* 41, 283-301 (1972).
- Curtis, D.R., A.W. Duggan und G.A.R. Johnston: The inactivation of extracellularly administered amino acids in the feline spinal cord. *Exp. Brain Res.* 10, 447-462 (1970).
- Curtis, D.R. und G.A.R. Johnston: Amino acid transmitters. *Handbook of Neurochem.* 4, 115-134 (1970).
- Curtis, D.R. und G.A.R. Johnston: Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Rev. of Physiol.* 69, 97-188 (1974).
- Curtis, D.R., J.E. Phillis und J.C. Watkins: The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J. Physiol. London* 150, 656-682 (1960).
- Curtis, D.R. und R.W. Ryall: Pharmacological studies upon spinal presynaptic fibres. *Exp. Brain Res.* 1, 195-204 (1966).

- Dale, H.M., F. Feldberg und M. Vogt: Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J. Physiol. London* 86, 353-380 (1936).
- Davidoff, R.A., L.T. Graham, R.P. Shank, R. Werman, M.H. Aprison: Changes in amino acid concentrations associated with loss of spinal interneurons. *J. Neurochem.* 14, 1025-1031 (1967).
- Davies, J. und J.C. Watkins: Is HA-966 a selective excitatory amino acid antagonist. *Nature New Biol.* 238, 61-63 (1972).
- Davies, J. und J.C. Watkins: Microelectrophoretic studies on the depressant action of HA-966 on chemically and synaptic excited neurones in the cat cerebral cortex and cuneate nucleus. *Brain Res.* 59, 311-322 (1973).
- Davis, R.: Brachio-rubral and rubro-brachial activity in the cat. *Brain Res.* 15, 157-173 (1969).
- Davis, R. und P.C. Vaughan: Pharmacological properties of feline red nucleus. *Int. J. Neuropharmacol.* 8, 475-488 (1969).
- Desi, I., I. Farkas, J. Sos und A. Balogh: Neurophysiological effects of glutamic acid ethylester. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 32, 323-335 (1967).
- Duggan, A.W.: The differential sensitivity to L-glutamate and L-aspartate of spinal interneurons and Renshaw cells. *Exp. Brain Res.* 19, 522-528 (1973).
- Eccles, J.C.: A review and restatement of the electrical hypotheses of synaptic excitatory and inhibitory action. *Arch. Sci. physiol.* 3, 567-584 (1949).
- Eccles, J.C.: The physiology of synapses. Springer Verlag, Berlin (1964).
- Eccles, Sir J., F.R.S. Rosamond, M. Eccles und M. Ito: Effects of intracellular potassium and sodium injections on the inhibitory postsynaptic potential. *Proc. Roy. Soc.* 160, 181-196 (1963).
- Eide, E.: Input amplifier for intracellular potential and conductance measurements. *Acta physiol. scand.* 73, 1A-2A (1968).

- Fatt, P. und B. Katz: An analysis of the endplate potential with an intracellular electrode. J. Physiol. London, 115, 320-370 (1951).
- Feldberg, W. und J.H. Gaddum: The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. J. Physiol. London 81, 305-319 (1934).
- Gerschenfeld, H.M. and A. Lasansky: Action of glutamic acid and other naturally occurring amino acids on snail central neurones. Int. J. Neuropharmacol. 3, 301-314 (1964).
- Graham, L.T. und H.M. Aprison: Distribution of some enzymes associated with the metabolism of glutamate, aspartate, γ -aminobutyrate and glutamine in cat spinal cord. J. Neurochem. 16, 559-566 (1969).
- Graham, L.T., R.P. Shank, R. Werman und M.H. Aprison: Distribution of some synaptic transmittersuspects in cat spinal cord: glutamic acid, aspartic acid, GABA and glutamine. J. Neurochem. 14, 465-472 (1967).
- Granit, R., D. Kernell, und G.K. Shortess: Quantitative aspects of repetitive firing of mammalian motoneurones caused by injected currents. J. Physiol. London 168, 911-931 (1963).
- Haldeman, S., R.D. Huffmann, K.C. Marshall und H. McLennan: The antagonism of the glutamate-induced and synaptic excitation of thalamic neurones. Brain Res. 39, 419-425 (1972).
- Haldeman, S. und H. McLennan: The antagonistic acition of glutamic acid diethylerster towards amino acid-induced and synaptic excitations of central neurones. Brain Res. 45, 393-400 (1972).
- Haldeman, S. und H. McLennan: The action of two inhibitors of glutamic acid uptake upon amino acid-induced and synaptic excitations of thalamic neurones. Brain Res. 63, 123-129 (1973).
- Hayashi, T: Effect of sodium glutamate on the nervous system. Keio J. Med. 3, 183-192 (1954).

- Henn, F.A. und A. Hamberger: Glial cell function: uptake of transmitter substances. *Proc. nat. Acad. Sci. Washington* 68, 2686-2690 (1971).
- Herz, A., W. Ziegelgänsberger und G. Färber: Microelectrophoretic studies concerning the spread of glutamic acid and GABA in brain tissue. *Exp. Brain Res.* 9, 221-235 (1969).
- Hoffer, J., N.H. Neff und G.R. Siggins: Microiontophoretic release of norepinephrine from micropipettes. *J. Neuropharm.* 10, 175-180 (1971).
- Ito, M. und T. Oshima: Electrical behaviour of the motoneurone membrane during intracellularly applied current steps. *J. physiol. London*, 180, 607-635 (1965).
- Jasper, H.H. und I. Koyama: Rate of release of amino acids from cerebral cortex in the cat as affected by brainstem and thalamic stimulation. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* 47, 889-905 (1969).
- Johnson, J.L.: Glutamic acid as a synaptic transmitter in the nervous system. A review. *Brain Res.* 37, 1-19 (1972).
- Johnson, J.L.: Aspartic acid as a precursor of glutamic acid and glycine. *Brain Res.* 67, 358-362 (1973).
- Johnson, J.L. und M.H. Aprison: The distribution of glutamic acid, a transmitter candidate, and other amino acids in the dorsal sensory neuron of the cat. *Brain Res.* 24, 285-292 (1970).
- Johnson, J.L. und M.H. Aprison: The distribution of glutamate and total free amino acids in thirteen specific regions of the cat CNS. *Brain Res.* 26, 141-148 (1971).
- Katz, B.: *Nerve, muscle and synapse.* McGraw-Hill Book Company, London (1966).
- Kerkut, G.A., A. Shapira und R.J. Walker: The effect of acetylcholine, glutamic acid and GABA on the contractions of the perfused cockroach leg. *Comp. Biochem. Physiol.* 16, 37-43 (1965).

- Kernell, D.: The limits of firing frequency in cat lumbosacral motoneurons possessing different time course of after-hyperpolarisation. *Acta Physiol. scand.* 65, 87-100 (1965).
- King, J.S., M.D. Richard und G.F. Martin: Anatomical evidence for an intrinsic neuron in the red nucleus. *Brain Res.* 67, 317-323 (1974).
- Koike, H., N. Mano, Y. Okada und T. Oshima: Activities of the sodium pump in cat pyramidal tract cells investigated with intracellular injection of sodium ions. *Exp. Brain Res.* 14, 449-462 (1972).
- Krnjević, K: Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.* 54, No. 2, 418-540 (1974).
- Krnjević, K. und J.W. Phillis: Ionophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. *J. Physiol. London* 165, 274-304 (1963).
- Krnjević, K. und S. Schwartz: Some properties of unresponsive cells in the cerebral cortex. *Exp. Brain Res.* 3, 306-319 (1967).
- Kuriyama, K., E. Roberts und T. Kakefuda: Association of the γ -aminobutyric acid system with a synaptic vesicle fraction from mouse brain. *Brain Res.* 8, 132-152 (1968).
- Loewi, O.: Über die humorale Übertragbarkeit der Herznervwirkung. *Pflüg. Arch.* 189, 239-242 (1921).
- Loewi, O. und E. Navratil: Über humorale Übertragbarkeit der Herznervwirkung. XI. Mitteilung. Über den Mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin. *Arch. Ges. Physiol.* 214, 689-696 (1926).
- Logan, W.J. und S.H. Snyder: High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain Res.* 42, 413-431 (1972).
- Longworth, L.G.: Diffusion measurements at 25⁰, of aqueous solutions of amino acids, peptides and sugars. *J. Am. Chem. Soc.* 75 d, 5705-5709 (1953).

- Massion, J.: The mammalian red nucleus. *Physiol. Rev.* 47, No. 3 (1967).
- McLennan, H.: Synaptic transmission. Saunders, Philadelphia (1963).
- Nastuk, W.L.: Membrane potential changes at a single muscle end-plate by transitory application of acetylcholine with an electrically controlled microjet. *Fed. Proc.* 12, 102 (1953).
- Nishi, S., H. Soeda und K. Koketsu: Effect of alkali-earth actions on frog spinal ganglion cells. *J. Neurophysiol.* 28, 457-472 (1965).
- Obata, K., K. Takeda und H. Shinozaki: Electrophoretic release of GABA and glutamic acid from micropipettes. *J. Neuropharmac.* 70, 9, 191-194 (1969).
- Olney, J.W., O.L. Ho und V. Rhee: Cytotoxic effects of acidic and sulfur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 14, 61-76 (1971).
- Otsuka, M., E.A. Kravitz und D.D. Potter: Physiological and chemical architecture of a lobster ganglion with particular reference to GABA and glutamic acid. *J. Neurophysiol.* 30, 725-752 (1967).
- Perry, T.L., K. Berry, S. Hansen, S. Diamond und C. Mork: Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy. *J. Neurochem.* 18, 513-519 (1971).
- Phillis, J.W.: The pharmacology of synapses. Pergamon, New York (1970).
- Rall, W.: Membrane potential transients and membrane time constant of motoneurons. *Exp. Neurol.* 2, No. 5, 503-532 (1960).
- Richter, D.W., W.R. Schlue, K.-H. Mauritz und A.C. Nacimiento: Comparison of membrane properties of the cell body and the initial part of the axon of phasic motoneurons in the spinal cord of the cat. *Exp. Brain Res.* 21, 193-206 (1974).

- Roberts, P.J.: The release of amino acids with proposed neurotransmitter function from the cuneate and gracile nuclei of the rat in vivo. *Brain Res.* 67, 419-428 (1974).
- Ryall, R.W.: The subcellular distributions of acetylcholine, substance P, 5-hydroxytryptamin, GABA and glutamic acid in brain homogenates. *J. Neurochem.* 11, 131-145 (1964).
- Salmoiraghi, G.C. und C.N. Stefanis: A critique of iontophoretic studies of central nervous system neurones. *Inter. Rev. Neurobiol.* 10, 1-30 (1967).
- Schwartzkroin, P. und P. Anderson: Glutamic acid sensitivity of dendrites in hippocampal slices in vitro. *Int. Symp. on Physiol. and Pathol. of Dendrites*, München (1974).
- Smith, T.G., R.B. Wuerker und K. Frank: Membrane impedance changes during synaptic transmission in cat spinal motoneurones. *J. Neurophysiol.* 30, 1072-1096 (1967).
- Sonnhof, U.: A multi-barrelled coaxial electrode for iontophoresis and intracellular recording with a gold-shield of the central pipette for capacitance neutralisation. *Pflügers Arch.* 341, 351-358 (1973).
- Sonnhof, U., P. Grafe, G. Krumnikl, M. Linder, L. Schindler: Glutamate, an excitatory transmitter in the spinal cord of the frog? *Pflügers Arch.* 347, Suppl. R31 (1974).
- Sonnhof, U., P. Grafe, G. Krumnikl, L. Linder, L. Schindler: Effects of some excitatory amino acids on motoneurones of the isolated spinal cord of the frog: Pharmacology and dependency from variations of extracellular ion concentrations. *Neurobiologentagung Göttingen* (1974).
- Steiner, F.A. und K. Ruf: Interactions of L-glutamic acid, thiosemicarbadid, and pyridoxal-5'-phosphate at single unit level in rat brain. *Brain Res.* 3, 214-216 (1966).
- Takeuchi, A. und N. Takeuchi: Electrical changes in pre- and postsynaptic axons of the giant synapse of *Loligo*. *J. gen. Physiol.* 45, 1181-1193 (1962).

- Takeuchi, A. und N. Takeuchi: The effect on crayfish muscle of iontophoretically applied glutamate. *J. Physiol.* London 170, 296-317 (1964).
- Thomas, R.C.: Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiol. Rev.* 52, 563-594 (1972).
- Toyama, K. N. Tsukahara, K. Kosaka und Matsunami, M.K.: Synaptic excitation of red nucleus neurones by fibers from interpositus nucleus. *Exp. Brain Res.* 11, 187-198 (1970).
- Toyama, K., N. Tsukahara und M. Udo: Nature of the cerebellar influence upon the red nucleus. *Exp. Brain Res.* 4, 292-309 (1968).
- Tredici, G., G. Pizzini und A. Miani: The ultrastructure of the red nucleus of the cat. *J. Submicr. Cytol.* 5, 29-48 (1973).
- Tsukahara, N., D.R.G. Fuller und V.B. Brooks: Collateral pyramidal influences on the cortico-rubro-spinal system. *J. Neurophys.* 21, No. 3, 467-484 (1968).
- Tsukahara, N. und D.R.G. Fuller: Conductance changes during pyramidally induced postsynaptic potentials in red nucleus neurones. *J. Neurophys.* 32, No. 1, 35-42 (1969).
- Tsukahara, N. und K. Kosaka: The mode of cerebral excitation of red nucleus neurones. *Exp. Brain Res.* 5, 102-117 (1968).
- Tsukahara, N., K. Toyama und K. Kosaka: Intracellularly recorded responses of red nucleus neurones during antidromic and orthodromic activation. *Exp.* 20,2, 632-633 (1964).
- Tsukahara, N., K. Toyama und Kosaka, K.: Electrical activity of red nucleus neurones investigated with intracellular micro-electrodes. *Exp. Brain Res.* 4, 18-33 (1967).
- Van den Berg, C.J., L.J. Kržalić, P. Mela und H. Waelisch: Compartmentation of glutamate metabolism in brain (Evidence of the existence of two different tricarboxylic acid cycles in brain). *Biochem. J.* 118, 281 (1969).

- Werman, R.: Criteria for identification of a central nervous system transmitter. *Comp. Biochem. Physiol.* 13, 745-766 (1965).
- Wofsey, A.R., M.J. Kuhar und S.H. Snyder: A unique synaptosomal fraction, which accumulates glutamic and aspartic acids in brain tissue. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68, No. 6, 1102-1106 (1971).
- Woodbury, J.W. und H.D. Patton: Electrical activity of single spinal cord elements. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 17, 185-188 (1952).
- Ziegelgänsberger, W., A. Herz und H. Teschemacher: Electrophoretic release of tritium-labelled glutamic acid from micropipettes in vitro. *Brain Res.* 15, 298-300 (1969).
- Ziegelgänsberger, W. und E.A. Paul: Actions of glutamic acid on spinal neurones. *Exp. Brain Res.* 17, 35-49 (1973a).
- Ziegelgänsberger, W. und E.A. Paul: Intracellular investigations on the effect of microelectrophoretically applied glutamate antagonists upon spinal neurones of the cat. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* 277, Suppl.: R89 (1973 b).

Diese Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der
Studienstiftung des Deutschen Volkes unterstützt.

Herrn Prof. Dr. K. Kramer danke ich für die Arbeitsmöglich-
keit, die er mir an seinem Institut einräumte.

Herrn Prof. Dr. G. ten Bruggencate gilt mein besonderer
Dank für die Überlassung des Themas und seine wertvolle
Unterstützung durch Anleitung und Diskussion.

Frau A. Pötschke, Fräulein L. Schindler und Herrn K.H.
Brehm danke ich für ihre stets hilfsbereite Assistenz
und Fräulein M. Hopfer für die Niederschrift dieser
Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 10. 11. 1946 wurde ich als Sohn des Dr. med. Johannes Steinberg und der Dr. med. Rita Steinberg, geb. Angerpointner in Jena geboren.

Von 1953 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Berlin-Karlshorst, nach der Flucht meiner Familie aus der DDR die 4. Klasse der Vorschule des Musikgymnasiums der Regensburger Domspatzen in Etterzhausen/Rgbg. 1957 trat ich in das Musikgymnasium der Regensburger Domspatzen ein, in dem ich 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Oktober 1966 bis zum Oktober 1967 leistete ich 1 Jahr meiner Wehrpflicht im Sanitätsdienst der Bundeswehr ab.

Im WS 1967/68 immatrikulierte ich mich an der Münchner Universität für das Fach Humanmedizin. 1967 bestand ich das Vorphysikum, 1970 das Physikum, am 19. Juni 1973 schloß ich mit dem Staatsexamen mein Medizinstudium ab.

Seit 1971 arbeite ich im Physiologischen Institut der Universität München in der Abteilung von Prof. G. ten Bruggen-cate.

